

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**PAMUKTA (*GOSSYPIMUM* L.) EPİALLELLERİN TESPİTİNDE
KULLANILABİLECEK GS-KUP MARKIRLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

Ayşe SAĞIR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**PAMUKTA (*GOSSYPIMUM L.*) EPİALLELLERİN TESPİTİNDE
KULLANILABİLECEK GS-KUP MARKIRLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

Ayşe SAĞIR
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PAMUKTA (*GOSSYPIMUM L.*) EPİALLELLERİN TESPİTİNDE
KULLANILABİLECEK GS-KUP MARKIRLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

Ayşe SAĞIR

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

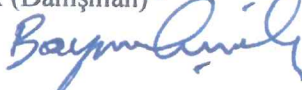
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 07/02/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet KARACA (Danışman)

Prof. Dr. Bayram ÇEVİK

Doç. Dr. Ayşe Gül İNCE


ÖZET

Pamukta (*Gossypium* L.) Epiallellerin Tespitinde Kullanılabilecek GS-KUP Markırlarının Geliştirilmesi

Ayşe SAĞIR

Yüksek Lisans Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet KARACA

Şubat 2020; 63 sayfa

Endüstri bitkileri içerisinde yer alan pamuk (*Gossypium* L.), sanayinin birçok dalının ana ham maddesi olması nedeniyle gerek dünya gerekse de ülkemiz açısından önemli bir bitkidir. Hızla artan dünya nüfusu ve insanların değişen ve gelişen hayat standartları pamuğa duyulan ihtiyacı arttırmaktadır. Geçmişte çok hücreli organizmaların gelişim sırasında tek tip hücrelerden doku ve organları oluşturmak amacıyla farklılaşmasını ifade etmek amacıyla kullanılan epigenetik sözcüğü bu günlerde DNA dizisinde değişiklik olmaksızın genlerin ifade edilmesinde meydana gelen kalıtsal değişiklikleri açıklamak için kullanılmaktadır. Epigenetik düzenlemeler arasında en fazla çalışılmış ve en fazla anlaşılmış olan mekanizma DNA metilasyonudur.

DNA metilasyonunun belirlenmesinde birbirlerinden farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada epiallellerin tespitinde kullanılabilecek ekonomik ve altyapı gerektirmeyen “Methylation Sensitive Amplification Polymorphism” (MSAP) yöntemine benzerlik gösteren ve birimimizde geliştirilen Gen Spesifik Kısmi Uzunluk Polimorfizm (GS-KUP) yönteminde kullanılacak lokus ve primer çiftlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada bitki materyali olarak dünya pamuk üretiminin %98’den daha fazlasının karşılandığı iki pamuk türü olan *G. hirsutum* L. ve *G. barbadense* L. DNA dizileri GenBank veri tabanından transfer edilerek kullanılmıştır. Belirli ölçüt kriterler kullanılarak GenBank veri tabanından indirilen DNA dizilerine spesifik primer çiftleri geliştirilmiştir. Geliştirilen primer dizileri üzerinde *MspI* ve *HpaII* izoşizomerlere ait palindromik tanıma bölgeleri bulunmakta olup, DNA palindromik bölgesinde yer alan sitozin bazında bulunabilecek metil grubuna göre farklılık tespit edilebilmektedir. Çalışmada 54 lokus üzerinde çalışma fırsatı sunan 88 adet primer çifti geliştirilmiştir.

Geliştirilen primer çiftlerinin yarısı *G. hirsutum* ve diğer yarısı da *G. barbadense* genom dizilerinden tasarlanmıştır. Primer çiftlerinin her iki genomda çoğaltım yapabilecekleri ön denemelerde ortaya konulmuştur. Bunun için altı lokus seçilerek GS-KUP yönteminde denemeler kurulmuştur. Ön denemelerde geliştirilen primer çiftlerinin ümitvar olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda lif gelişimiyle ilgili epiallellerin tespitinde kullanılabilecek oldukları görülmüştür. Tez çalışması kapsamında tasarlanan primer çiftleri ile epiallel markırları geliştirilerek bu markırların pamuk ıslahında lif kalite ve miktarının artırılmasına yönelik çalışmalarda kullanılabilecek olanağı sunabileceği öngörülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışma son yıllardaki artış ile birlikte dünya pamuk üretiminin %98’lik kısmını kapsayan iki pamuk türünün epigenetik çalışmalarına farklı açılardan katkı sağlayabilecektir. Geliştirilen primer çiftleri ile hedeflenen gen ve gen bölgelerinde metilasyon düzeylerinin tespitinde kullanılacak markırların geliştirilmesinin yanı sıra ilgili genlerin ve gen elementlerinin epigenetiksel düzenlemelerinin anlaşılmasında da katkılar sağlanabilecektir.

ANAHTAR KELİMELEER: DNA metilasyonu, Epigenetik, Epigenetik düzenlemeler, GS-KUP markır, *Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*, Lif özellikleri, Primer çifti

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet KARACA

Prof. Dr. Bayram ÇEVİK

Doç. Dr. Ayşe Gül İNCE

ABSTRACT

Development of GS-RLP Markers for Detection of Epialleles in Cotton (*Gossypium* L.)

Ayşe SAĞIR

M.Sc. Thesis in the Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet KARACA

February 2020; 63 pages

As an industrial crop cotton (*Gossypium* L.), is the main raw material of many types of the industry, and it is important for the world and Turkey. The rapidly increasing world population and changing and developing life standards of people increase the need for cotton. The word epigenetics, was used in the past to express the differentiation of multicellular organisms during development to form tissues and organs from uniform cells. However, nowadays it is used to describe hereditary changes occur in the expression of genes without alteration in DNA sequences. Among epigenetic regulations, the most studied and understood mechanism is the DNA methylation.

Different methods has been used for determining DNA methylation. The aim of this study, loci and primer pairs for detection of epialles by the Gen Specific Restriction Length Polymorphism (GS-RLP) method developed in our labratory and similar to Methylation Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP). In the study, DNA sequences of two cotton types, *G. hirsutum* L. and *G. barbadense* L. species, constituting more than 98% of the world cotton production was used. The sequences were downloaded from the GenBank database and primer pairs were designed using certain criteria. Palindromic recognition regions of *Msp*I and *Hpa*II isochisomers were present in the developed primer sequences. The differences in DNA sequence can be determined based to the methyl group found on the cytosine nucleotide of DNA in the palindromic region. In the study, 88 primer pairs covering 54 loci was developed.

Half of the developed primer pairs was from *G. hirsutum* and the other half from *G. barbadense* genomic sequences. It was demonstrated in preliminary experiments that primer pairs can amplify target sequences from the genomes of both species. For this, six loci and spesific primer pairs were selected and utilized in the GS-RLP method. Primer pairs developedand used in preliminary experiments were promising for the detection of epialleles. In this context, the results suggested that these primer pairs can be used for the detection of epialleles related to fiber development. Therefore the developed primer pairs can also be used to developing markers in deterimination of the quality and quantity of fiber in cotton.

G. hirsutum and *G. barbadense* are two cotton species constituting 98% of the world cotton production. Methylation sensitive primer pair specific to these species developed in this study is not only used for the development of markers but also useful for understanding the epigenetic arrangements and regulations of genes and gene elements related to fiber properties.

KEY WORDS: DNA methylation, Epigenetics, Epigenetic arrangements, Fiber properties, GS-RLP marker, *Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*, Primer pair

COMMITTEE: Prof. Dr. Mehmet KARACA

Prof. Dr. Bayram ÇEVİK

Assoc. Prof. Dr. Ayşe Gül İNCE

ÖNSÖZ

Giderek artan dünya nüfusu yiyecek, içecek, barınma gibi önemli sorunları beraberinde getirmektedir. Pamuk öncelikli olarak tekstil sanayisi için yetiştirilmekle beraber sanayinin birçok dalında kullanılmakta ve insan ihtiyaçlarını karşılamada önemli bir bitki haline gelmektedir. Pamuk bitkisinin üretim maliyeti yüksek, hastalık ve zararlıları fazladır üstelik pamuk bitkisine alternatif olarak üretilen sentetik liflerin üretimi giderek artmakta ve pamuk üretimi azalmaktadır. Tekstil sanayisinde sentetik liflerin en çok kullanılan lifler olmasına rağmen, sanayileşen toplumlarda gelişmişlik düzeyinin ve doğa bilincinin artması, güneşten gelen zararlı ışınlarla karşı doğal pamuğun sentetik liflerden daha korunaklı olması, organik tarımın artmasıyla insanların doğal olan ürünlere yönelmeye başlamış olması pamuğa dayalı ürün kullanımı arttırmıştır. Ülkemiz doğal lif üreten ülkeler arasındadır. Üretim sürecinde fazla olan girdi miktarını azaltmak ve pamuk lif kalitesini arttırmaya yönelik ıslah çalışmaları devam etmekte olup hali hazırda istenilen bütün özellikleri kapsayan bir pamuk çeşidi geliştirilebilmiş değildir.

Bu tez çalışmasında son yıllardaki artış ile birlikte nerdeyse dünyanın %98'lik üretimini kapsayan iki pamuk türü olan Upland ve Mısır tipi pamuklar kullanılmış olup seçilen gen ve gen bölgelerinin metilasyon düzeyi farklılıklarının çalışılabilmesinde, lif özellikleriyle ilgili genlerin ve gen elementlerinin epigenetiksel düzenlemelerinin belirlenmesine de katkılar sunabilecek primer çiftleri belirlenmiş olup bu primer çiftleri kullanılarak epiallelik markırlar geliştirilebilecektir.

Çalışmamın her aşamasında bilgi, beceri ve deneyimlerini benden esirgemeyip, yön veren, en ince detayına kadar tezimle ilgilenen, danışmanım olmasından her daim onur duyduğum büyük bir özveri, yüksek bir dikkat ve titizlik ile yaptığı çalışmalarını örnek aldığım, bilim etiğini, eğitimini ve bakış açısını bana kazandıran saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Karaca'ya tez çalışmamda olan katkılarından dolayı teşekkür eder, sonsuz saygılarımı sunarım. Laboratuvar çalışmalarında yaptığı katkılarıyla bana yardım eden, bilgisini ve hayat tecrübesini benden esirgemeyen, tezimin jüri üyeliğine değerli vaktinden zaman ayırarak katılımlarıyla beni onurlandıran Sayın Doç. Dr. Ayşe Gül İNCE hocama en içten teşekkürlerimi sunarım. Yoğun çalışmaları arasında değerli zamanından ödün vererek tez savunmamda bulunduğu ve tezime yaptığı katkılarından dolayı Prof. Dr. Bayram ÇEVİK hocama içten teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Tezimde kullandığım sayısal verileri sınıflandırmamda ve bu bilgilere ulaşmamda bana yardımcı olan Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) Tarımsal İstatistikçi Arap Diri'ye, yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olup bana yardım eden tüm arkadaş ve hocalarıma teşekkür ederim.

Aldığım kararları her zaman destekleyen, beni bu günlere getiren ve her zorluğun üstesinden gelebileceğime inanan başta annem olmak üzere bütün aile bireylerime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	12
2.1. Pamuğun Orijini ve Kültüre Alınışı.....	12
2.2. Epigenetik ve Epiallel.....	14
2.3. DNA Metilasyonu	17
2.4. Histon Modifikasyonları	19
2.5. RNA İnterferans (RNAi).....	19
2.6. Epigenetik Markırlar.....	19
2.7. Metilasyon Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi (MSAP).....	19
2.8. PCR İçin Primerlerinin Tasarlanmasında Kullanılan Ağ Tabanlı Programlar	20
3. MATERYAL VE METOD	23
3.1. <i>In Silico</i> Yöntemler.....	23
3.1.1. Hedef gen elementlerinin tespiti	23
3.1.2. Gen elementlerinde restriksiyon enzim tanıma dizilerinin tespiti	23
3.1.3. Gen elementleri için primer dizilerinin belirlenmesi.....	23
3.2. <i>In Vitro</i> Yöntemler.....	25
3.2.1. Bitki materyali	25
3.2.2. DNA ekstraksiyonu.....	25
3.2.3. DNA miktarı ve saflığının belirlenmesi	26
3.2.3.1. Spektrofotometre yöntemi	26
3.2.3.2. Agaroz jel elektroforez yöntemi.....	27
3.3. Genomik DNA Örneklerinin Normalleştirilmesi ve Konsantrasyonu	28
3.4. Genomik DNA Örneklerinin <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> Enzimleri İle Kesilmesi	28
3.5. Hedef Lokusların Restriksiyon Enzimleriyle Kesiminin Kontrol Edilmesi.....	28
3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	28
3.6.1. PCR protokolü	29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali.....	31
4.2. DNA Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi	33
4.2.1. Spektrofotometrik yöntem ile DNA analizi.....	33
4.2.2. Agaroz jel elektroforez yöntemi ile yapılan analizler	35
4.3. Lif Gen Spesifik Metilasyon Duyarlı Markırlar İçin Primer Çiftlerinin Belirlenmesi.....	36

4.4. Restriksiyon Enzim Uygulamaları.....	52
4.5. Hedef Lokusların Amlifikasyonu ve GS-KUP Markırları.....	52
5. SONUÇLAR	56
6. KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	

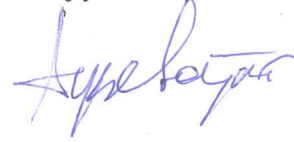


AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Pamukta (*Gossypium* L.) Epiallellerin Belirlenmesinde Kullanılabilecek GS-KUP Polimorfizm Markırlarının Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışmanın akademik kurallar ve etik değerlere uygun olduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

07/02/2020

Ayşe SAĞIR



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

.	: ondalık
°	: derece
%	: yüzde
µL	: mikrolitre
bp	: “base pair” , baz çifti
CH ₃	: metil
dk	: dakika
gr	: gram
M	: molarite
mL	: mililitre
ng	: nanogram
nm	: nanometre
°C	: santigrat derece
kb	: kilobaz
pH	: “ <i>potentia Hydrogeny</i> ”
PJ	: Potansiyel Joule
sn	: saniye
X	: kez
xg	: kütle çekimsel güç, gravitasyon
µg	: mikrogram
µM	: mikromolar

Kısaltmalar

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	: “Amplified Fragment Length Polymorphism”
B. Stoğu	: Başlangıç stoğu
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: “Ethylene di-amin Tetra Acetic Acid”
EST	: “Expressed Sequence Tag”
GB	: “ <i>Gossypium barbadense</i> ”
gDNA	: Genomik DNA

GH	: “ <i>Gossypium hirsutum</i> ”
ha	: hektar
ICAC	: “International Cotton Advisory Committee”
MK	: Mehmet Karaca
MSU	: “Mississippi State University”
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI	: Primer ID veya Adı
Primer I.	: Primer ID veya Adı
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QTL	: “Quantitative Trait Locus”
RAPD	: “Random Amplified Polymorphic DNA”
REKB	: Restriksiyon Enzimi Kesim Bölgesi
RNA	: Ribonükleaz
s	: saat
S	: Sıralama
SSRs	: “Simple Sequence Repeats”
TBE	: “TRIS-Borik asit-EDTA”
TM-1	: “Texas Marker-1”
TR	: “Tandem Repeat”
TRIS	: “Tris (hydroxymethyl)aminomethane”
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
U	: uzunluk
USDA	: “United States Department of Agriculture”
UTR	: “Untranslated Region”
UV	: “Ultraviolet light”
MT	: milyon ton
F	: “Forward” İleri primer
R	: “Reverse” Geri primer,

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Pamuğun (<i>Gossypium</i> L.) bazı kullanım alanlarının şematik gösterimi.....	1
Şekil 4.1. Saksı ve sera koşullarında yetiştirilen pamuklar	31
Şekil 4.2. DNA ekstraksiyonu aşamaları	32
Şekil 4.3. Spektrofotometre ile DNA kalitesinin belirlenmesi	34
Şekil 4.4. Agaroj jel elektroforez aşamaları.....	35
Şekil 4.5. <i>Msp</i> I ve <i>Hpa</i> II enzimleriyle kesimi yapılan TM-1 ve Pima 3-79 DNA'ların PCR amplifikasyon sonucu	54



ÇİZELGELER DİZİNİ

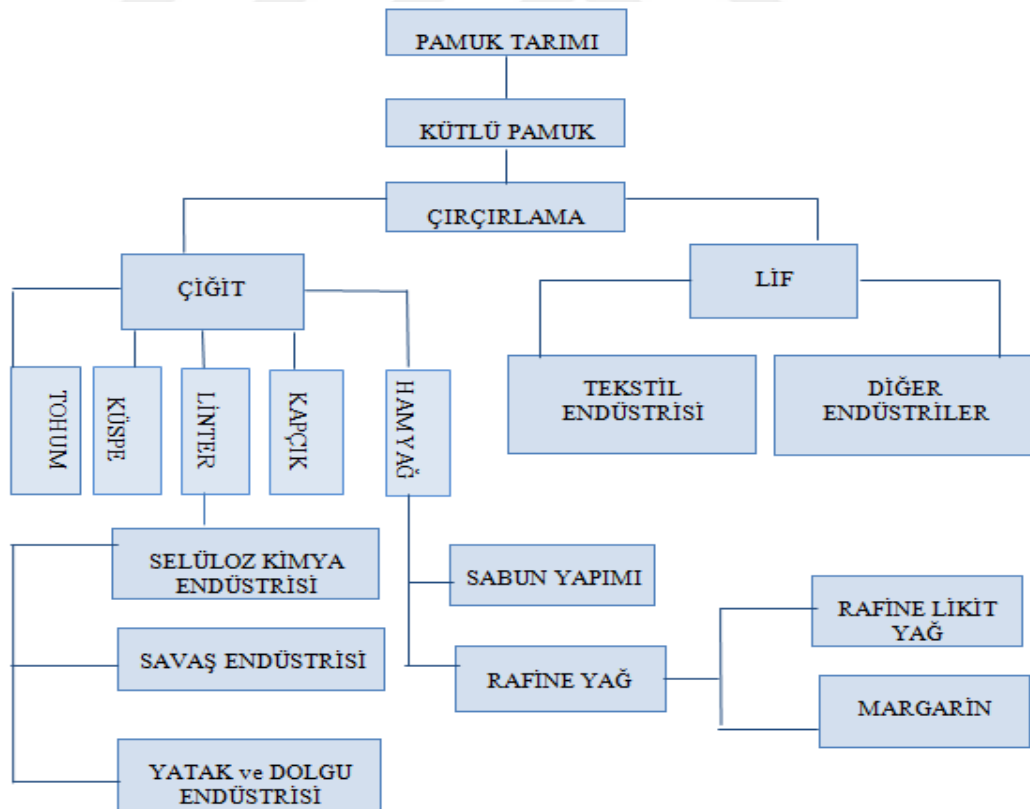
Çizelge 1.1. ICAC dünya pamuk ekim alanları (bin ha).....	2
Çizelge 1.2. ICAC verilerine göre dünya pamuk lifi üretimi (bin ton).....	3
Çizelge 1.3. ICAC veri tabanı dünya pamuk verimleri (kg/ha).....	3
Çizelge 1.4. ICAC veri tabanı dünya pamuk lifi tüketimi (bin ton)	4
Çizelge 1.5. ICAC veri tabanı dünya ithalatı (bin ton)	5
Çizelge 1.6. ICAC veri tabanı dünya pamuk ihracatı (bin ton)	5
Çizelge 1.7. Dünya pamuk arz ve talebi (MT).....	6
Çizelge 1.8. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 1991-2018 bölgelere göre ekim alanı (bin da)	6
Çizelge 1.9. TÜİK 1991-2018 bölgelere göre kütlü pamuk üretimi (bin ton).....	7
Çizelge 1.10. TÜİK 1991-2018 bölgelere göre kütlü verimi (kg/da)	7
Çizelge 1.11. TÜİK 1991-2018 bölgelere göre lif üretimi (bin ton)	8
Çizelge 1.12. Bölgelere göre lif verimi (kg/da)	8
Çizelge 1.13. TÜİK 2009-2017 pamuk çiğidi ithalat ihracat verileri (bin ton)	9
Çizelge 2.1. Primer tasarlamak amacıyla kullanılan bazı programlar	21
Çizelge 3.1. Genomik DNA örneklerinin normalleştirilmesi ve konsantrasyonu	28
Çizelge 3.2. Gen spesifik kesilmiş amplifikasyon polimorfizm yönteminde PCR’da kullanılan kimyasallar ve kullanım miktarları	29
Çizelge 3.3. PCR amplifikasyon profili	29
Çizelge 4.1. TM-1 ve Pima 3-79 çeşitlerine ait $A_{260/280}$ spektrofotometre okumaları	34
Çizelge 4.2. <i>Gossypium hirsutum</i> için dizayn edilen gen spesifik primer çiftleri	38
Çizelge 4.3. <i>Gossypium barbaense</i> için dizayn edilen gen spesifik primer çiftleri	42
Çizelge 4.4. <i>Gossypium hirsutum</i> için dizayn edilen primerlere ait özellikler ve restriksiyon enzimi kesim bölgesi sayısı.....	47
Çizelge 4.5. <i>Gossypium barbadense</i> için dizayn edilen primerlere ait özellikler ve restriksiyon enzimi kesim bölgesi sayısı.....	49
Çizelge 4.6. Epiallelik farklılıkların belirlenmesinde oluşan paternler	53

1. GİRİŞ

Pamuk (*Gossypium* L.) hem lifi ile hem de tohumunun (çiğit) sanayinin birçok kolunda kullanılması nedeniyle endüstri bitkileri içerisinde önemli bir yere sahiptir. Yaklaşık 7.6 milyarlık dünya nüfusu sürekli artış göstermekte ve nüfus artışıyla birlikte gıda ve tekstil sanayisinin önemi günden güne artmaktadır. Dünyada bitkisel orijinli tekstil sektörünün doğal ana ham maddesi pamuk olup pamuğu jüt takip etmektedir. Pamuk gerek çok çeşitli kullanım alanları gerekse üretildiği yerlerde insanlara sağladığı iş olanakları ile insan yaşamının önemli bir parçasıdır (Karaca vd. 2019).

Pamuk kütlüsü çırçır sanayinde işlendikten sonra tohum ve lif olarak ayrılır. Pamuk lifi ile tekstil ve diğer sanayi kollarında (örme sanayi, dokuma sanayi), tohumu ile tohumluk, küspe (hayvan yemi), linteri ile yatak ve dolgu malzemesi, selüloz ve kimya endüstrisinde hem kâğıt hem sentetik kumaşların yapımında, kozmetik endüstrisinde kullanımı, para kâğıdı yağımı, savaş endüstrisinde barut yapımı, ham yağ ile sabun yapımı, plastik ve muşamba sanayinde, murfak yağı üretimi (margarin, rafine sıvı yağ üretimi), biyodizel üretimi gibi pek çok alanda ham madde olarak kullanılmaktadır (Aydın 2018).

Şekil 1.1’de pamuk tarımı ve yan ürünleri özet olarak gösterilmektedir. Şekilde 1.1’de görüldüğü üzere birinci derecede lif bitkisi olan pamuğun lif sanayi (tekstil) dışında da oldukça fazla tüketim alanı bulunmaktadır.



Şekil 1.1. Pamuğun (*Gossypium* L.) bazı kullanım alanlarının şematik gösterimi

Pamuk tarımı dünyada 45° Kuzey, 32° Güney enlemlerine kadar uzanmaktadır. 2017-2018 yılı Uluslararası Pamuk İstişare Komitesi (“International Cotton Advisory Committee”(ICAC)) verilerine göre pamuk tarımı 75 ülkede yapılmaktadır. Pamuk tarımının en az yapıldığı ülke toplam 11 ha ile Filipinler iken en fazla yapıldığı ülke Hindistan’dır. Dünyada az sayıda ülke pamuk tarımına elverişli olması nedeniyle, dünya üretiminin %80’ine yakını Türkiye’nin de içinde bulunduğu az sayıda ülke tarafından gerçekleştirilmektedir (Anonim 1).

Türkiye coğrafi konum olarak 36°- 42° Kuzey enlemleri arasında yer almaktadır. Ülkemiz bulunduğu konum gereği pamuk tarımı yapılmasına elverişlidir. Türkiye’de pamuk tarımı yoğun olarak Ege Bölgesi, Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Akdeniz Bölgesi’nde bulunan Çukurova ve Antalya yörelerinde yapılmaktadır. Pamuk tarımı sadece bu alanlarla sınırlı kalmamıştır. Pamuk tarımı yaz yağışlarının görülmediği ve yaz sıcaklıklarının düşük olmadığı yerlerde yapılabilir. Nitekim Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre mikroklima olarak Balıkesir, Bursa, Çanakkale, Iğdır, Şırnak ve Ankara (2006-2009) gibi farklı bölgelerde bulunan illerde de üretim yapılmaktadır.

Çizelge 1.1.’de görüldüğü gibi Uluslararası Pamuk Danışma Komitesi (ICAC) verilerine göre; 2017/2018 üretim döneminde dünyada en fazla ekim 11340 bin ha ile Hindistan’da yapılırken Hindistan’ı, ABD 4473 bin ha ile 2. olarak, Çin 3220 bin ha ile 3. olarak, Pakistan 2720 bin ha ile 4. olarak, ve Özbekistan 1208 bin ha ile 5. olarak takip etmiştir. Türkiye 2013-2017 yılları arası 5 yıllık ekim döneminde 2013 yılından sonra azalma gösterirken 2017-2018 ekim döneminde artış göstermiş ve dünya ekim alanı sıralamasında 10. sırada yer almıştır. Geride bıraktığımız ekim döneminde dünya genelinde toplam 31 milyon 802 bin 923 ha pamuk ekimi yapılmıştır. Bu dönemde yapılan pamuk ekiminden 24.96 milyon ton pamuk elde edilmiştir.

Çizelge 1.1. ICAC dünya pamuk ekim alanları (bin ha)

S	Ülkeler	2013/14	2014/15	2015/16	2016/217	2017/18
1	Hindistan	11960	12846	11877	10500	11340
2	ABD	3053	3783	3268	3848	4473
3	Çin	4800	4310	3362	3126	3220
4	Pakistan	2806	2958	2902	2496	2720
5	Özbekistan	1275	1298	1298	1250	1208
6	Brezilya	1122	976	955	939	996
7	Burkina Faso	645	661	663	740	759
8	Mali	480	570	573	656	689
9	Türkmenistan	550	545	545	545	545
10	Türkiye	445	460	434	420	470
11	Benin	380	379	307	418	450
	Diğer	52134	5115	4447	4585	5311
	Toplam	32730	33902	30631	29524	31803

*ICAC “International Cotton Advisory Committee World Cotton Database” (Uluslararası Pamuk İstişare Kurulu Dünya Pamuk Veri Tabanı) S: Sıralama

Çizelge 1.2’de görüldüğü gibi dünyada en fazla pamuk üretimi yapan Çin Halk Cumhuriyeti (Çin) iken son 3 yıllık ekim döneminde bu durum değişmiş en fazla üretim yapan ülke Hindistan olmuştur. Ekim alanı Çin’den daha fazla olan ABD üretim miktarında Çin’in gerisinde kalmıştır.

Ekim alanı yönünden karşılaştırıldığında ülkemiz Burkina Faso, Mali ve Türkmenistan’dan daha az olmasına rağmen, üretimde bu ülkeleri geride bırakmış ve dünya sıralamasında 8. sırada yer almıştır (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. ICAC verilerine göre dünya pamuk lifi üretimi (bin ton)

S	Ülkeler	2013/2014	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018
1	Hindistan	6766	6562	57460	5775	6132
2	Çin	6950	6550	49883	4871	5017
3	Amerika	2811	3553	2806	3738	4468
4	Pakistan	2076	2305	154	1663	1952
5	Brezilya	1734	1563	1289	1485	1555
6	Avustralya	885	528	629	960	9972
7	Özbekistan	910	885	8323	789	800
8	Türkiye	688	720	640	703	792
9	Burkina Faso	270	298	244	285	308
10	Türkmenistan	337	545	315	2920	301

S: Sıralama

Çizelge 1.3’te görüldüğü gibi 2013-2017 yılları arası 5 yıllık dünya pamuk lif verimleri ICAC veri tabanına göre en verimli ülke Avustralya iken son yıllarda bu durum değişmiş hektar başına 1892 kg ile en verimli ülke İsrail olduğu Çizelge 1.3’te görülmektedir.

Çizelge 1.3. ICAC veri tabanı dünya pamuk verimleri (kg/ha)

S	Ülkeler	2013/2014	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018
1	İsrail	1897	2020	1891	1761	1892
2	Avustralya	2258	2779	2330	1722	1737
3	Türkiye	1546	1565	1475	1674	1685
4	Brezilya	1546	1601	1350	1580	1561
5	Meksika	1625	1577	1523	1590	1559
6	Çin	1448	1520	1484	1558	1558
7	Yunanistan	1190	1007	908	1009	1028
8	ABD	921	939	859	972	999
9	G. Afrika	1172	1205	1208	850	998
10	Suriye	976	976	879	983	954

S: Sıralama

Türkiye son yıllarda verimini artırarak dünya pamuk verimi sıralamasında 3. sıraya yerleşmiştir. Pamuk verimi ve ekilen alan ile beraber değerlendirildiğinde ekim alanı en geniş olan üç ülke Hindistan, ABD ve Çin verim sıralamasında ekim alanı kendisinden az olan İsrail, Avustralya, Brezilya ve Meksika'nın gerisinde kalmıştır. %20 oranında bir tarım alanına sahip olan İsrail kısıtlı kaynaklarına rağmen uyguladığı tarım sistemi ile pamuktan diğer ülkelerden daha fazla verim almaktadır. Ülkemiz ekim alanı bakımından dünyada 10. sırada yer almaktadır. Ülkemizin nüfusu ve artan insan ihtiyaçları göz önünde bulundurulduğunda, ekim yapılan alanlar daha iyi değerlendirmeli ve üretimimiz artırılmalıdır.

Çizelge 1.4'te görüldüğü gibi dünyanın en kalabalık ülkesi olan Çin pamuk lifi tüketiminde 1. sırada yer alırken, onu nüfus açısından dünyanın 2. kalabalık ülkesi olarak takip eden Hindistan 2. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.4). Dünyanın 3. kalabalık ülkesi olan ABD ise, dünya pamuk lifi üretiminde 3. sırada olmasına rağmen pamuk tüketiminde 729 bin ton ile 8. sırada yer almaktadır. Dünyanın en kalabalık 17. ülkesi olan Türkiye ise pamuk tüketiminde 1450 bin tonla 5. sırada yer almaktadır. 792425 tonluk pamuk lifi üretimi ile tüketimimiz karşılaştırıldığında ihtiyacımızın %54.65'i ülkemizde üretilmekte %45.35'i dışarıdan karşılanmaktadır.

Çizelge 1.4. ICAC veri tabanı dünya pamuk lifi tüketimi (bin ton)

S	Ülkeler	2013/2014	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018
1	Çin	7600	7657	7580	77321	7713
2	Hindistan	5087	5377	5296	5148	5266
3	Pakistan	2470	2467	2147	2147	2233
4	Bangladeş	1129	1197	1316	1409	1512
5	Türkiye	1400	1486	1500	1450	1450
6	Vietnam	673	875	1007	11676	1308
7	Brezilya	862	797	701	722	737
8	ABD	773	778	751	751	729
9	Endonezya	683	711	654	667	700
10	Meksika	406	410	418	385	3961

S: Sıralama

Çizelge 1.5'te görüldüğü gibi Bangladeş dünyadaki en büyük pamuk ithalatçısı ülke konumundadır. Bangladeş'i sırasıyla Vietnam, Çin, Endonezya ve Türkiye takip etmektedir. Türkiye dünya pamuk ithalatında 714 bin ton ile listede yer alan 5. büyük ülkedir (Çizelge 1.5). Çizelge 1.6'da görüldüğü gibi ABD dünyadaki en fazla pamuk ihracatı yapan ülkedir (Çizelge 1.6). Ekim alanı açısından 2. üretim açısından 3. verimi açısından 8. sırada yer alan ABD ürettiği pamuğun büyük bir kısmını kullanmayıp ihraç etmektedir. ABD'yi Hindistan, Avustralya, Brezilya ve Özbekistan takip etmektedir. 55 bin ton ihracat ile dünya sıralamasında 15. sırada yer alan Türkiye pamuk ihracatından daha çok pamuk ithalatı yapılmaktadır (ICAC 2018).

Çizelge 1.5. ICAC veri tabanı dünya ithalatı (bin ton)

S	Ülkeler	2013/2014	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018
1	Bangladeş	1112	1183	1378	1412	1545
2	Vietnam	687	934	1001	1207	1341
3	Çin	3075	1804	959	1057	1071
4	Endonezya	687	728	640	721	717
5	Türkiye	924	800	918	704	714
6	Pakistan	247	166	585	538	393
7	Hindistan	147	267	234	475	329
8	Tayland	337	320	278	267	276
9	Meksika	223	211	222	230	236
10	Kore	280	288	256	229	236

S: Sıralama

Çizelge 1.6. ICAC veri tabanı dünya pamuk ihracatı (bin ton)

S	Ülkeler	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18
1	Amerika	2293	2449	1993	3247	3089
2	Hindistan	2015	914	1258	909	927
3	Avustralya	1057	520	616	754	774
4	Brezilya	458	520	939	610	650
5	Özbekistan	615	550	500	337	370
6	Burkina Faso	270	252	271	247	261
7	Mali	198	186	221	247	260
8	Yunanistan	280	254	209	209	210
9	Benin	140	112	108	142	164
10	Türkmenistan	354	325	273	178	161
11	Fildişi Sahili	180	188	142	138	121
12	Kamerun	101	89	110	111	99
13	Tacikistan	83	87	79	73	72
14	Çad	32	46	57	42	67
15	Türkiye	44	51	50	78	55

S: Sıralama

Çizelge 1.7’de görüldüğü gibi dünya pamuk arz talebi Şubat 2019 raporuna göre son iki yıllık ICAC verileri başlangıç stoğu, üretim, arz, tüketim, ihracat yönünden ele alındığında, dünyada pamuk üretim miktarı tüketici gereksinimini karşılayamamaktadır ve ihtiyaç stoklardan sağlanmaktadır. ICAC Sekreterliği 2017-2025 döneminde küresel lif talebinin 25.5 milyon ton artarak 121 milyon tona çıkacağını tahmin etmekte ve bunun dünya pamuk sektörü için önemli bir fırsat içerdiğine dikkat çekmektedir. Bu dönem zarfında kişi başına pamuk tüketiminin 4 kg artabileceği ve böylece alınan toplam lif talebinin %28’inin pamuk endüstrisi tarafından karşılanabileceği öngörülmektedir (Balçık 2019).

Çizelge 1.7. Dünya pamuk arz ve talebi (MT)

	2016/2017		2017/2018		2018/2019*	
	MT	Değişim/Ay	MT	Değişim/Ay	MT	Değişim/Ay
B. Stoğu	20.31	-0.03	18.77	-0.04	18.51	-0.24
Üretim	23.05	0.00	26.72	-0.03	25.92	-0.24
Arz	45.38	-0.03	45.49	-0.07	44.44	-0.24
Tüketim	24.50	0.00	26.88	0.07	26.80	-0.10
İhracat	8.19	0.01	9.09	0.10	9.34	-0.08
Biten	18.77	-0.04	18.51	-0.24	17.64	-0.58

ICAC Şubat 2019 () Tahmin Raporu, MT: Milyon Ton, B. Stoğu: Başlangıç stoğu

Çizelge 1.8’de verilen 1991-2018 yılları arası TÜİK 5 yıllık değişim verileri incelendiğinde Türkiye pamuk üretiminin büyük bir bölümünü yapan iki bölge ve iki yörede pamuk ekim alanı Güneydoğu Anadolu Bölgesinde %152.38 oranında artış gösterip genişlerken, Ege Bölgesinde %59.14, Çukurova’da %47.55, Antalya’da %77.16 oranında azalma göstermiş ve söz konusu bu yerlerde pamuk ekim alanı daralmıştır.

1991-2018 yılları arası toplam pamuk ekim alanı TÜİK verileri incelendiğinde ise -13.36’lık bir ekim alanı daralması söz konusu olsa da 2016 yılında yaklaşık %22’lik bir azalma göstermiştir. Ancak son iki yılda pamuk ekim alanında artış gözlenmektedir.

Çizelge 1.8. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 1991-2018 bölgelere göre ekim alanı (bin da)

Yıllar	Ege	Güneydoğu Anadolu	Çukurova	Antalya	Toplam
1991	2465	1239	1718	219	5986
1996	2536	2262	2013	280	7438
2001	2277	2874	1320	106	6846
2006	1466	3095	1170	42	5907
2011	967	3139	1322	59	5420
2016	944	2383	672	59	4243
2017	1074	2932	875	58	5019
2018	1007	3127	901	50	5186
Değişim %	-59.14	152.38	-47.55	-77.16	-13.36

Bölgelere göre kütlü üretimi incelendiğinde 2018 yılında ülkemizden üretilen pamuğun 355.97’lik değişim yüzdesi ile %56.42’si Güney Doğu Anadolu Bölgesi’nde üretilmiştir. Aynı dönem verilerine göre Çukurova yöresinde %16.16’lık bir üretim artışı sağlanırken Ege Bölgesi ve Antalya yöresinde sırasıyla %13.83 ve %58.33’lük azalma meydana gelmiştir.

Çizelge 1.9’da da görüldüğü gibi üretimde düşüş meydana gelmiş olmasına rağmen sonraki dönemlerde kütlü pamuk üretimimiz artmış 1991 yılı ile 2018 yılları arasındaki değişim yüzdesine bakıldığında ise değişim miktarı %69.97 oranında artmış olduğu görülmektedir.

Çizelge 1.9. TÜİK 1991-2018 bölgelere göre kütlü pamuk üretimi (bin ton)

Yıllar	Ege	G. Doğu Anadolu	Çukurova	Antalya	Toplam
1991	629	318	433	60	1512
1996	672	670	582	87	2082
2001	714	1033	489	37	2358
2006	552	1331	774	20	2550
2011	451	2178	614	30	2580
2016	5001	1147	405	29	2074
2017	556	1376	456	27	2450
2018	542	1450	503	25	2570
Değişim %	-13.83	355.97	16.16	-58.33	69.97

Çizelge 1.10’da verilen bölgelere göre kütlü verimi incelendiğinde pamuk üretimimizin yapıldığı bütün alanlarda verim artışı 1991’den bu yana verim artışı sağlanmıştır. Türkiye dünya pamuk verimi sıralamasında 3. sıradadır.

Çizelge 1.10. TÜİK 1991-2018 bölgelere göre kütlü verimi (kg/da)

Yıllar	Ege	G. Doğu Anadolu	Çukurova	Antalya
1991	255	256	265	276
1996	265	296	230	300
2001	314	360	317	348
2006	377	430	459	490
2011	433	387	495	404
2016	502	398	478	430
2017	474	369	448	403
2018	502	376	507	435
Değişim %	96.86	46.87	91.32	57.60

Çizelge 1.11’de gösterildiği gibi ülkemiz bölgelere göre lif üretim durumundaki değişime bakıldığında pamuk üretiminin yoğun olarak yapıldığı yerlerde en olumlu değişimi yaşayan bölge üretimini neredeyse 5 kat arttırmış olan Güneydoğu Anadolu Bölgesi’dir. Çukurova yöresi ise üretimini arttıran ikinci pamuk üretim bölgesi olmuştur. Ege Bölgesi ve Antalya yöresinde ise lif üretim miktarında azalma söz konusudur. Bu azalmanın yaşanmasının sebepleri arasında bu bölgelerdeki ekim alanında meydana gelen önemli derecede azalmanın payının olduğu düşünülebilir. Bu yıllar arasındaki toplam lif üretimine bakıldığında ise Güneydoğu Anadolu Bölgesi’ndeki artış miktarı, Antalya yöresi ve ona oranla daha az bir düşüş yaşayan Ege Bölgesi’ndeki azalmayı telafi etmiş ve lif üretim miktarını %74.77 oranında arttırmıştır.

Çizelge 1.11. TÜİK 1991-2018 bölgelere göre lif üretimi (bin ton)

Yıllar	Ege	G. Doğu Anadolu	Çukurova	Antalya	Toplam
1991	233	117	160	22	559
1996	269	250	206	32	774
2001	285	402	181	14	914
2006	221	502	230	7	977
2011	167	535	227	11	955
2016	180	413	149	10	756
2017	200	495	164	10	882
2018	206	551	191	9	977
Değişim %	-11.58	370.94	19.3	-59.09	74.77

Çizelge 1.12’de görüldüğü üzere lif verimimizde %50.52 ile %103.19 artış sağlanmıştır. Lif verimindeki en büyük değişim Ege Bölgesi’nde yaşanırken onu Çukurova ve Antalya yöreleriyle, Güneydoğu Anadolu Bölgesi izlemiştir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi’ndeki lif üretimi neredeyse 5 kat artmasına rağmen birim alandan alınan ürün, üretimin yapıldığı diğer 3 bölgeye göre daha az olmuştur.

Çin, Hindistan ve Pakistan ile rekabet içerisinde olan Türkiye pamuk sektörü, bu ülkelerdeki ucuz hammadde, işçilik, enerji fiyatları, makineleşme, yeni teknolojilere adaptasyon ve verim düzeyi yüksek transgenik tohumların kullanımının artması vb durumlar nedeniyle rekabette zorlanmaktadır. Son birkaç yıllık periyoda bakıldığında yurtdışı pamuk ihraç fiyatlarının yüksek seyretmesinin yanında, yurtiçi fiyatların düşüklüğü pamuk tarımı yapan üreticilerin daha fazla kar elde etmek için mısır, soya ve sebze gibi alternatif ürünlerin üretimine yönelmelerine sebep olmaktadır (Çetin ve Karadeniz 2013).

Çizelge 1.12. Bölgelere göre lif verimi (kg/da)

Yıllar	Ege	G. Doğu Anadolu	Çukurova	Antalya
1991	94	95	98	102
1996	106	111	109	113
2001	125	140	119	133
2006	151	162	172	181
2011	160	143	183	168
2016	181	144	204	155
2017	171	133	160	145
2018	191	143	193	166
Değişim %	103.19	50.52	96.93	62.74

Çizelge 1.13'te görüldüğü üzere 2009-2017 yılları arası ithal ettiğimiz pamuk tohumu (çiğit) yıllara göre azalmakla birlikte 2012 yılında yaklaşık 20 bin tonluk bir artış göstermiştir. Daha sonraki yıllarda azalma devam etmektedir ancak 2017 yılında yine bir yükselme yaşanmıştır. İhraç ettiğimiz pamuk tohumu azalma göstermektedir ancak 2014-2015 yıllarında 15 bin tonluk bir artış yaşamış olmasına rağmen elde edilen son verilere göre yine azalmaya başlamıştır.

2009-2017 yılları arası çiğit ithalatı incelendiğinde %98.81'lik azalma meydana gelirken ihracatta da %40.29'luk bir azalma meydana gelmiştir. Türkiye ürettiği pamuk tohumu ile kendi kendine yetebilen bir ülke haline gelmiştir. İthalat ve ihracat verileri beraber incelendiğinde ülkemize ait pamuk ticaretinde dengesizlikler yaşandığı açıktır.

Çizelge 1.13. TÜİK 2009-2017 pamuk çiğidi ithalat ihracat verileri (bin ton)

Yıllar	İthalat çiğit ton	İhracat çiğit ton
2009	35.229	22.242
2010	10.159	19.342
2011	81	12.162
2012	21.002	6.727
2013	6.115	5.221
2014	1.863	20.473
2015	83	21.1840
2016	85	12.559
2017	416	13.28
Değişim %	-98.81	-40.29

G. hirsutum'un %90'ını oluşturmalarıyla birlikte *G.hirsutum* ve *G. barbadense* en fazla tarımı yapılan başlıca pamuk türleridir (Karaca 2001;Jenkins 2003). *G. barbadense* dünya lif üretiminin yaklaşık %5'ini temsil eder (Wu vd. 2005). Doğada *G. hirsutum* çalı formunda yaklaşık olarak 1-1.5 m'ye kadar yetişirken *G. barbadense* yaklaşık olarak 3 m yüksekliğe kadar yetişir. Ancak her iki türde ticari olarak bitkiler toplandıktan sonra tohum ve lif için hasat edilmesiyle yılda yaklaşık olarak 1-1.5 m boyunda yetiştirilir.

Türkiye tükettiği lifin 2/3'ni ithal etmektedir (Anonim 2). Yaklaşık bir denge halinde olan pamuk üretimi gelecek yıllar düşünüldüğünde artacak olan insan nüfusuna bağlı olarak içerisinde pamuğunda bulunduğu üç ana ürünün [lif (pamuk), şeker (şeker pancarı, şeker kamışı) ve un (buğday, çeltik)] üretiminin artırılması konusunda araştırmaların artırılması gerektiği açıktır (Karaca ve Ince 2019).

Geçmişte çok hücreli organizmaların gelişim sırasında tek tip hücrelerden doku ve organları oluşturmak amacıyla farklılaşmasını ifade etmek amacıyla kullanılan epigenetik sözcüğü bu günlerde DNA dizisinde değişiklik olmaksızın genlerin ifade edilmesinde meydana gelen kalıtsal değişiklikleri açıklamak için kullanılmaktadır. Söz konusu epigenetik değişimler mitotik ve mayotik olarak nesilden nesile aktarılmakta ve korunmaktadır. Epigenetik düzenlemeler, metilasyon, histon modifikasyonları, asetilasyonları ve DNA sitozin metillenmesi ile meydana gelmesine rağmen “small

nuclear RNA (smRNA)”, “non-coding RNA” (kodlamayan RNA (ncRNA))’ların üretilmesi ve işlevi ile de gerçekleşir. Genin kromozom üzerindeki lokasyonu, uzaysal konumu, biyotik ve abiyotik çevre faktörlerinin etkisiyle epigenetik farklılıklar ortaya çıkabilmekte ve bunun sonucunda DNA, histonlar, RNA ve kromatinde epigenetik değişimler meydana gelebilmektedir (Sumulder ve de Klerk 2011; 2012 Xu; Fan vd. 2013; Karaca ve Ince 2016; Lu vd. 2017; Ince ve Karaca 2019).

Epigenetik düzenlemeler arasında en fazla çalışılmış ve en fazla anlaşılmış olan mekanizma DNA metilasyonudur. Gen promotörlerinde kromatin ve gen transkripsiyonunun baskılanmasıyla veya aktivasyonu ile DNA sitozin metilasyonu ilişkilendirilebilir. DNA molekülündeki sitozinin beşinci karbonuna bir metil grubunun metil transferazlar ve RNA tarafından desteklenen mekanizmalarla bağlanması DNA metilasyonu olarak tanımlanmaktadır. Bitki genomlarında genellikle CG, CHG veya CHH (H harfi A veya T veya G nükleotitlerinden herhangi biri anlamına gelmektedir) dizilerini içeren bölgelerde yer alan DNA metilasyonu, memelilerde CG dinükloit bölgelerde bulunmaktadır (Smulder ve De Klerk 2011; Karaca vd. 2016).

Karaca ve Ince (2017)’da “DNA metilasyonunun belirlenmesinde birbirlerinden farklı değişik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında Yüksek Performanslı Likit Kromatografi (HPLC), İnce Tabaka Kromatografi (TLC), Metilasyon Duyarlı Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MS-PCR), Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Metilasyon Duyarlı Çoğaltılmış Fragman Polimorfizmi (AFLP veya MSAP), Birleştirilmiş Bisülfid Restriksiyon Analizi (COBRA), Metilasyon Duyarlı Tek Nükleotit Uzatımı (Ms-SNuPE), Metilli DNA İminopresipitasyonu (MeDIP), Hibridizasyon Dizinleri (Arreyleri), Restriksiyon Genomu Taraması, bisülfid uygulamasın ardından Sonraki Nesil Sekanslama, Tek Molekül Gerçek Zamanlı DNA sekanslaması, Kütle Spektrometry (Mass Spectrometry) Tek Molekül Gerçek Zamanlı DNA sekanslaması, Restriksiyon İşaretili Genomik Tarama (Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS), MALDI-TOF MS, İleri Nesil Sekanslama (NGS) tabanlı Bütün Genom Bisülfid Sekanslama (WGBS) ve benzeri yöntemlerdir” olarak sıralamışlardır.

GS-KUP yöntemi prensip olarak MSAP yöntemine benzerlik göstermektedir. Ancak GS-KUP yönteminde hedef gen ve gen elementlerine bilinçli olarak yönlendirilebilmesi ve değişik izoşizomerlerin (farklı kaynaklardan elde edilen ancak aynı tanıma dizilerine sahip metilasyon duyarlı ve duyarsız enzimler) kullanılabilmesi en önemli avantajıdır. Maliyetinin bisülfid sekanslama yöntemiyle karşılaştırıldığında oldukça düşük olması, analizlerin kolay olması, küçük laboratuvarlara uygun olması diğer bazı avantajlarındandır.

Bu yöntemin en büyük dezavantajı olarak enzim tabanlı olması nedeni ile kesim polimorfizminin DNA’nın kalitesiyle doğrudan ilişkili olması ve hedef metilasyon dizilerinin kısıtlı olması (örneğin CG motiflerinde metilasyonu belirleyebilmesi) gelmektedir. Bu yöntemin diğer bir dezavantajı ise polimorfizm belirleme durumu fragman (bant) tabanlı olup metilasyonun DNA düzeyinde belirlenmesi için ek çalışmalara ihtiyaç duymasındır. Örneğin çalışmada kullanılan her bir örnek en az iki farklı enzim ile muamele edilmek ve her örnek jel üzerinde ikişer kez analiz edilmek zorundadır.

Bisülfıt sekanslama DNA sitozin metilasyonunu incelemek için güçlü bir tekniktir. Bisülfıt muamelesinin ardından PCR amplifikasyonu spesifik olarak metillenmemiş sitozinleri timine dönüştürür. Sonraki nesil generasyon sekanslama (NGS) teknolojisiyle birleştğinde genomdaki her bir sitozinin metilasyon durumunu belirleyebilir. Ancak yüksek verimlilikteki bisülfıt bisülfıt referans genomda kalıntıları büyük okumayla artan araştırma alanı okuması, bisülfıt sekansın karmaşıklığı, timin alaymınt (gruplaşma)'larına asimetrik sitozin ve çoklu CG heterojen metilasyonundan dolayı büyük bir zorlukla okur (Xi ve Li 2009).

Bu tez çalışmasının ana amacı bisülfıt sekanslama (BS), sonraki nesil sekanslama ve genotipleme (GBS, WGR) yöntemlerinin uygun olmadığı (maliyet, yüksek örnek sayısı, yüksek ploidy, karmaşık genomlar vb) durumlarda epiallellerin tespitinde kullanılabilecek ekonomik ve alt yapı gerektirmeyen Gen Spesifik Kesilmiş Uzunluk Polimorfizm (GS-KUP) markırlarının geliştirilmesinde kullanılabilecek primer çiftlerinin geliştirilmesidir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Pamuğun Orijini ve Kültüre Alınışı

Gossypium cinsi Linneaus tarafından 18. yüzyılın ortalarında adlandırılmıştır (Smith 1995). Pamuk cinsi, sadece dokuz cins içeren küçük bir taksonomik kabile olan *Gossypieae*'ye aittir (Fryxell 1968, 1978). Evrimi ve kültüre alınışı oldukça eski zamanlara dayanmakla birlikte, DNA dizi verileri pamuk türlerinin, yaklaşık 10-20 milyon yıl önce ortaya çıktığını göstermektedir (Seelanan vd. 1997). Avustralya, özellikle Kuzeybatı Avustralya'da Kimberley bölgesi, Afrika Boynuzu ve Güney Arap Yarımadası ile Orta ve Güney Meksika'nın batı kısmı tür çeşitliliği fazla olan bölgelerdir (Wendel vd. 2009). Bütün diploid türler aynı kromozom sayısını (n=13) paylaşımlarına rağmen genom başına DNA içeriğinde üç kattan fazla varyasyon taşımaktadır (Hendrix ve Stewart 2005). Günümüzde sekiz diploid genom grubu (A'dan G'ye ve K) bilinmektedir (Endrizzi vd. 1985; Stewart 1995).

Asya ve Afrika'dan iki diploid (*G. arboreum* ve *G. herbaceum*), Amerika'dan iki allotetraploid (*G. hirsutum* ve *G. barbadense*) olmak üzere dört tür tohum ve lifleri için birbirinden bağımsız olarak kültüre alınmıştır. Kültüre alınan söz konusu dört türde yerli halk pamuk liflerinin eşsiz özelliklerinin halat, tekstil ürünleri ve diğer uygulamalar için yararlı hale getirdiğini keşfetmişlerdir (Wendel vd. 2009; Wendel ve Grover 2015).

Kültüre almanın ana dezavantajı genetik çeşitliliğin azalmasına neden olunmasıdır. Bu genetik fark eksikliği *G. hirsutum* L. türlerinde *G. barbadense* türlerinden daha fazla görülür (Rahman vd. 2012). Bunun açıklaması ise *G. hirsutum* L. türüne ait daha fazla kültür çeşitinin varlığıdır. Kültüre alınan türlerden her biri bu süreçte çeşitli aşamaları genetik çeşitliliğin var olan örneklerinin kökenini, eşlik eden genetik darlığın şeklini ve şiddetini açıklayan birçok makale vardır ve bu makalelerde açıklandığı gibi kendine özgü kültüre alma, çeşitlendirme ve kullanım geçmişine sahiptir. *Gossypium* türleri, çeşitli otsu uzun ömürlü bitkilerden, çeşitli üreme ve vejetatif özelliklere sahip 15 m ağaçlara kadar olağanüstü morfolojik varyasyon gösterir (Wendel ve Grover 2015).

Pamuk *Gossypium* L. yaklaşık 52 türe sahiptir ve bu türlerden dördü, iki diploid ve iki allotetraploid 80'den fazla ülkede üretimi yapılmaktadır (Anonim 3; Karaca vd. 2019). Bunlardan ikisi Afrika-Asya türleri olan; diploid genoma sahip *G. arboreum* (Ağaç pamuk, Hindistan) ve *G. herbaceum* (Levant pamuğu, Afrika) iken diğer ikisi ise allotetraploid genoma sahip yeni dünya pamukları olan *G. hirsutum* (Upland pamuğu, Güney Amerika) ve *G. barbadense* (Pima pamuğu/Mısır pamuğu, Güney Amerika) pamuklarından oluşmaktadır (Karaca 2001; Mert 2007).

Veriler, tetraploid pamuğun nispeten yakın bir zamanda, belki de son 1-2 milyon yıl içinde ortaya çıktığını, ardından hızlı bir şekilde evrimleştiğini ve çeşitlendiğini göstermektedir (Wendel vd. 1989). Günümüzde büyük ticari öneme sahip iki tür (*G. hirsutum* ve *G. barbadense*) dâhil olmak üzere allotetraploid pamukların, cinsin en erken bölünmesinden inen iki genomun (A ve D) biyolojik olarak birleşmesinden sonra oluştuğu kabul edilmektedir. Yani, allotetraploid pamuğun iki bileşenli genomu, ilk olarak farklı kıtalarda evrimleşmiştir ve milyonlarca yıl boyunca birbirinden izole

olarak ayrılmıştır. Allotetraploid pamuklar bu nedenle çoğu genin çoğaltılmış fakat biraz farklı kopyalarını içerir (Wendel ve Grover 2015).

G. hirsutum ve *G. barbadense* en yaygın tarımı yapılan pamuk türleridir. *G. hirsutum*, yüksek lif verimi için yetiştirilen küresel pamuk üretimine egemen olurken, *G. barbadense* yüksek lif kalitesi nedeniyle yetiştirilmektedir. Her iki tür de günümüz *G. arboreum* (A-genom) ve *G. raimondii* (D-genom) türlerine benzer diploid öncülerinden türetilen allotetraploidler (AADD-genom) olup atalarına göre üstün lif verimi ve kalitesine sahiptir (Wendel ve Cronn 2003).

Dünyanın en büyük germplazm koleksiyonu US Department of Agriculture at College Station TX (ABD Tarım Bakanlığı Kolej İstasyonu, Teksas) tarafından korunurken diğer büyük germplazm kaynakları Hindistan, Özbekistan ve Fransa'da muhafaza edilmektedir (Stewart 2010).

Pamuk (*Gossypium* L. *Malvaceae* familyası) dünya ekonomisine lider lif bitkisi ve önemli yağlı tohumlu olarak katkıda bulunur (Rahman vd. 2012). Dünyanın en çok kullanılan doğal elyafını üreterek tekstil ve hazır giyim endüstrilerinin temelini oluşturur (Flagel vd. 2012). Pamuk lifi üretiminde her biri farklı özellikler için yetiştirilen iki tür egemendir. Yaygın olarak Upland pamuğu (yayla pamuğu) olarak bilinen *G. hirsutum* yüksek verim potansiyeli, çeşitli çevre koşullarına ve üretim sistemlerine adaptasyonu nedeniyle en yaygın yetiştirilen pamuk türüdür.

Mısır pamuğu, Sea Island veya ekstra uzun lif pamuğu olarak bilinen *G. barbadense*, Upland pamuğundan çok üstün kalitelidir. Ancak bu ikinci türün adaptasyonu Amerikada Arizona ve Kaliforniya'nın kurak bölgelerinde sulanan alanlar ile Nil Nehri deltası ve kıyılarında sınırlıdır. Ancak *G. barbadense*'nin benzersiz lif özellikleri onu Upland pamuğunun lif kalitesini arttırmak için faydalı, yeni genetik çeşit sağlamak için uygun bir aday haline getirir (Chee vd. 2005).

Pamuk (*Gossypium* L.) dünya ekonomisi için çok önemli olduğundan, tarım bilimcilerinin, taksonomistlerin ve evrimsel biyologların dikkatini çekmektedir (Wendel ve Grover 2015). Dünya çapında doğal tekstil endüstrisinde egemen olan pamuk M. Ö. 6000'den beri lifi ve linteri için yetiştirilmektedir.

Hamawand vd. (2016) pamuk endüstrisi atıklarından biyoenerji potansiyelini ele almışlardır. Buna göre kompostlama, gazlaştırma, piroliz, fermantasyon (etanol), anaerobik sindirim ve doğrudan yakmanın pamuk biyokütle atıklarını kullanmak için birer seçenek olduğunu bu atıklardan elde edilecek enerjinin çok daha yüksek sermaye maliyetlerini dengeleyebileceğini pamuk sapının, mısır bitkisi ve soya fasulyesi kalıntılarına kıyasla en yüksek yanma verimini ve en uzun yanma süresini sağladığını ve yanan pamuk saplarından üretilen potansiyel enerji miktarının 24.8 PJ civarında olabileceğini ve bunun da 97 milyon dolarlık kömüre eşdeğer olduğunu ortaya koyan çalışmalar yapmışlardır.

Yan Hu vd. (2019) allotetraploid pamuğun orijini ve evrimi hakkında bilgi sağlayan çalışmalarında *G. hirsutum* ve *G. barbadense*'yi kullanmışlar ve *G. barbadense*de daha uzun lifler gelişmesinden moleküler mekanizmaların sorumlu olduğunu göstermişlerdir.

2.2. Epigenetik ve Epiallel

Mendel genetiğinde kalıtım DNA dizisindeki değişikliklere dayanır ve bu değişiklikler mayoz bölünme boyunca tam olarak iletilir. Genetik sistemler, hücre soyları içindeki klonal kalıtım üzerine dayanır ve hücrelerin veya organizmaların fenotipi eninde sonunda DNA'daki bilgilere bağlıdır. Karmaşık organizmalarda klasik genetik sistemi üzerine kalıtımın diğer bir tipi eklenir. Tek hücreli zigotun klonal genişlemesi hücre tiplerinin çeşitliliğine yol açar. Gelişim süreci sırasında hücreler kararlı hale gelir veya belirlenir, yani son organizmada belirli bir role, konuma veya kadere atanır. Doku ve organlar oluşukça hücreler uygun hücre fonksiyonları için farklılaşır veya uzmanlaşır ve farklılaştıktan sonra çok stabildir (Holliday 1993).

Bir organizmaya ait farklı doku ve organlarında bulunan ve tamamen aynı DNA sekansına sahip olan hücrelerin nasıl birbirlerinden farklı işlevlere sahip olabildikleri, tek yumurta ikizlerinin aynı genetik özelliklere (DNA dizisi) sahip olmasına rağmen farklı hastalıklara genetik yatkınlıklarının olabildiği, insanlarda lenfositlerin hücre bölünmesi yoluyla fenotiplerini stabil olarak koruyabildikleri, neredeyse özdeş DNA dizisine sahip olan ve aynı nükleoplazma içinde bulunan XX kromozomundan hangisinin inaktive edileceğinin neye dayanarak belirlendiğini, aynı bitki üzerinde bulunan iki yaprağın neden birbirinden farklı olabildiği, örneğin pamukta birbiriyle aynı genetik materyale sahip olan ovul epidermal hücrelerinin birbirinden farklı gelişim göstermesi gibi farklı durumların bir bölümünün modern moleküler biyolojik yaklaşımlar ve tekniklerle ifade edilememesinden dolayı epigenetik ve epiallel kavramları ortaya çıkmıştır (Karaca ve İnce 2015).

Epigenenez kelimesi anlam olarak incelendiğinde eski Yunanca'da "epi" ön eki "üstü" veya "ötesi" anlamlarını taşıırken "genesis" kelimesi "doğuş", "köken" ve "oluşum" anlamlarını taşımaktadır (İnce ve Karaca 2019). Yeni bir organizmanın gelişimini açıklamak için'dan Democritus ve Leucippus gibi diğer filozofların tercih ettiği bir teori olan preformasyondan (Eşey hücresinde ergin bireyin minyatürünün bulunduğu kabul edildiği eski bir teori) ayırt etmek için ilk olarak Aristoteles tarafından önerilen epigenez kavramının kökeni antik Yunanistan'dadır (Tsaftaris vd. 2008). Epigenetik epigenez sürecini kapsar.

Epigenetik farklı bilim adamlarına göre farklı anlamlara gelmektedir. Epigenetik terimi ilk olarak 1942'de Conrad Waddington tarafından kullanılmıştır (Karaca vd. 2019). Conrad Waddington epigenetiği genotiplerin gelişim sırasında fenotiplere yol açması olarak tanımlarken Arthur Riggs ve arkadaşları epigenetiği "DNA dizilimindeki değişikliklerle açıklanamayan, gen fonksiyonunda mitotik veya mayotik olarak kalıtsal değişikliklerin araştırması" olarak tanımlamıştır (Bird 2007).

Holliday (1994), epigenetiği, farklılaşmış hücelere sahip organizmalarda meydana gelen gen ekspresyonundaki değişikliklerin ve verilen gen ekspresyonu modellerinin mitotik kalıtımının incelenmesi olarak tanımlamıştır. Çok hücreli organizmalar genetik olarak homojen fakat yapısal ve fonksiyonel olarak genlerin farklı ekspresyonundan dolayı heterojendirler. Gen ekspresyonundaki bu farklılıkların çoğu gelişme sırasında ortaya çıkar ve mitoz yoluyla korunur. Bu şekilde meydana gelen değişikliklerin epigenetik olduğu söylenir (Jaerisch ve Bird 2003).

Epigenetik terimiyle ilgili birçok tanımlama olmasıyla birlikte fikir birliğine varılan tanımlama birincil DNA sekansından bağımsız olarak ortaya çıkan değişikliklerden dolayı fenotipte meydana gelen kalıtsal değişiklikler olduğu yönündedir. Epigenetik bilginin kalıtsallığının yıllarca hücre bölünmesiyle sınırlı olduğu düşünülse de daha sonradan epigenetik işlemlerin bir organizmadan bir organizmaya transfer edildiği ortaya çıkmıştır (Tollefsbol 2011).

Epigenetik bağlantıların belirlendiği ilk model organizma *Drosophila* (Meyve Sineği)'dir. En geleneksel model organizmalardan olan *Saccharomyces cerevisiae* ve *Schizosaccharomyces pombe* (Mantarlar) epigenetiğin anlaşılmasına katkı sunan organizmalardandır. Ancak epigenetik ile ilgili çok sayıda bilgi özellikle *Zea mays* (Mısır) ve *Arabidopsis thaliana* (Fare Kulağı Teresi) ile çalışılmasıyla beraber ortaya çıkmıştır (İnce ve Karaca 2019). Memelilerde ise fare ve insanda gen regülasyonu ve hücre kimliğini anlama yolunda büyük adımlar atılmıştır (Bonosio 2015). Seymour vd. (2008) meyve gelişimi ve olgunlaşmada görev alan genlerin epigenetiksel olarak regüle edilebileceğini belirtmişlerdir.

Epigenetiğin bilim adamları arasında (en başta kliniksel tıp, adli tıp, eczacılık, temel bilimler, bitkisel ve hayvansal üretim alanında çalışan) büyük ilgi uyandırmasının sebebi moleküler biyolojinin ana kuralı olan santral dogmada ortaya koyulan hücredeki bütün fizyolojik ve fenotipik olayların salt DNA dizisinden şifrelenmediğinin ortaya koyulmasıdır (Karaca ve Ince 2015). Furrow vd. (2011) epigenetik kalıtımın çevresel faktörlerden etkilendiğini ve bu bulgunun kayıp kalıtımın belirlenmesinde önemli olduğunu, Van Ijzendoorn (2011) kalıtım hesabında G x E etkileşiminde epigenetik katkının eklenmesi gerektiğini vurgulamıştır.

Epigenetik, genetiğinin ötesindeki süreçlere, özellikle gelişim sırasında genler arasındaki etkileşimlere değinmektedir ve yaygın kullanımıyla artık, gen ekspresyonunu değiştirme potansiyeline sahip kromozomal modifikasyonlara atıfta bulunmaktadır. Teknolojik gelişmelerle birlikte epigenetik, türler, dokular ve hücre tipleri arasındaki çeşitliliği detaylandırmaya odaklanan açıklayıcı bir aşamaya girmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda insanlarda, yüksek ökaryotlarda ve hatta bireyler arasında bile DNA metilasyon paternlerinde değişiklik olduğu bildirilmiştir (Diez vd. 2014; İnce ve Karaca 2019).

Epigenetik varyasyon transkripsiyonu ve dolayısıyla fenotipleri etkileyebildiği için adaptasyona katkıda bulunabilir (Kawakatsu vd. 2016). Pamuk lif ve yağ üretiminin arttırılmasında tarımsal yaklaşımlar (sulama, gübreleme, hastalık ve zararlılarla mücadele) ile birlikte genetik ve epigenetik faktörler de son derece önemlidir. Epigenetik faktörler zorunlu genetik bağımlı, genetik bağımsız ve seçmeli epigenetik faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Epigenetik özellik taşıyan allelelere epialleler adı verilir. Farklı epialleler arasında DNA dizi farklı bulunmaz. Pamukta genetik faktörler özellikle post transkripsiyon tabanlı faktörlerin lif gelişimi ve tekstil özellikleri üzerinde önemli olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan aralarında vernalizasyon, çiçeklenme, biyotik ve abiyotik stres faktörler, circadian ritimleri, bazı lif karakteristik özellikleri ise epigenetik faktörler tarafından düzenlendiği bilinmektedir (Karaca ve Ince 2017a).

Agorio vd. (2017) epialleli nesiller arasında kalıtsal olarak iletilen epigenetik işaretlere dayanan gen varyantları olarak tanımlamışlardır ve yabani türlerde bilinen epiallellerin çoğunun bitki popülasyonlarında tanımlanmış olduğunu ancak bu epiallellerden çok azının fenotipik ya da agronomik özelliklerle ilişkili olduğunu söylemişlerdir. Karaca vd. (2019) epiallelin çoğu sözlükte “genetik bir lokusun spesifik bir DNA metilasyon paterni” ya da “metilasyon bakımından farklı olan özdeş gruptan herhangi biri” olarak dar anlamda epiallelin tanımlamasının var olduğunu, ve var bu tanımlamalara diğer epigenetik mekanizmaların da dahil edilmesiyle birlikte epiallelin tanımlanması geniş bir şekilde düşünülebileceğini söylemişler ve epialleli “herhangi başka bir grubun aynı lokusunda farklı kalıtsal kimyasal modifikasyonlar içeren metilasyon, asetilasyon, ubikülinasyon, fosforilasyon ve sümlasyon” olarak tanımlamışlardır.

Tanımlanan bitki epiallelleri çiçek tipi, bitki ve tohum pigmentasyon düzeyleri ve patojen direncinin yanı sıra çeşitli gelişimsel ve fenolojik özellikler de dahil olmak üzere önemli ekolojik özellikleri etkiler. Epigenetik alleller veya epialleller spesifik gen dizilerinde gen dizilerindeki metillenmiş nükleotitlerin sayısı ve dağılımında farklılık gösterir. Farklı epiallellere sahip olan bitkiler farklı fenotipler oluşturabilir (Bitki epiallelleri genellikle mitotik olarak ve birçok durumda mayotik olarak kalıtsaldır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kalıtsal olan bir kaç epiallel keşfedilmiştir (SUP ve FWA) (Kalisz 2004; İnce ve Karaca 2019).

Goettel ve Messing (2013) mısırdaki epiallel biyogenezi ile ilgili yaptıkları çalışmada sitozin metilasyonu ile iki epiallel P1-rr ve P1-pr'in, gen ekspresyonu ve dolayısıyla fenotipteki değişkenlik ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Weigel ve Colot (2012) çevrenin, epigenetik değişikliğinin etkisindeki payını araştırmak için farklı koşullar tarafından etkilenen epigenom çapında varyasyonlarının incelenmesinin gelecek için önemli olduğunu ve buna ilaveten genetik ve epigenetik düzeydeki epiallellerin boyutlarını nasıl etkilediği hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç olduğunu ve son olarak epimutasyonların evrime katkıda bulunabileceği sınıflandırma ölçeklerini tanımlayan bir popülasyon epigenetiği teorisine ihtiyaç olduğunu söylemişlerdir. Epialleller sadece onlarca nesil boyunca devam etseler bile onlar hala önemli evrimsel etkilere sahiptir.

Gen ekspresyonunun derecesini düzenleyen epiallelik değişimler mutasyonlara oranla daha az aşırı olabileceğinden yoğun bir seçimle karşılaşmayıp, yeni habitatları keşfedebilir ve kısa vadede diğer genlerle birlikte koadaptasyon yapmayı kolaylaştırabilir buna ek olarak epialleller bir popülasyonda ayrışıyor, metilasyonu, tarihsel fenotipi değişken çevresel bir çevre düzenlemesi haline gelen bir genin fenotipik etkisini değiştirebiliyorsa, hızlı çevresel değişim dönemlerinde genomu geçici olarak “koruyabilir” (Kalisz 2004).

G. hirsutum ve *G. barbadense* genomlarına ait lif özelliklerinde bulunan farklılıklar uzun zamandır bilim adamları tarafından büyük ilgi görmektedir ve bu özellikler üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Örneğin Karaca vd. (2019) *G. hirsutum* (Upland)'a ait TM-1 ve *Gossypium barbadense* (Mısır pamuğu)'ye ait Pima 3-79 ve *G. barbadense* 25 günlük pamuk lifinde ifade edilen bir epiallelin belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada lif uzama proteini (FCEP) epiallel tespiti için kullanılacak bir yöntem olduğunu bulmuşlardır.

Linaria vulgaris'te yabani tip bilateral simetrik çiçeklerin radyal olarak simetrik çiçek mutantları doğada bulunmaktadır. Moleküler genetik çalışmaları radyal formların çiçek asimetrisinin gelişmesine sebebiyet veren bir transkripsiyonel aktivatörü kodlayan *Cycloidea* (CYC) geninin epiallellerinden kaynakladığını ortaya koymuştur. Doğal epimutasyonun ikinci bir örneği renksiz ve olgunlaşmamış (CNR) lokusu domateslerden belirlenmiştir (Weigell ve Colot 2012).

Mısır (*Zea mays*)'ta, doğal olarak oluşan epiallelik değişiklikler, değişik tohum ve vejetatif doku pigmentasyonuna yol açan R, B, Pl ve P pigmentasyon genlerinde tarif edilmiştir. *A. thaliana*'da yapılan bir genetik haritalama çalışmasında nükleoler düzenleyici bölgelerde (NOR) bulunan rDNA lokuslarındaki metilasyon seviyelerinde doğal farklılıklar göstermiştir. Kalıtsal epialleller hem fenotipik özellik hem de dayanıklılık üzerindeki etkileri ile yabani bitki popülasyonlarının evrimini etkileyecektir. Metilasyon değişiklikleri, gen ifadesinin miktarını veya derecesini düzenleyebildiği için epialleller, ayrık fenotipik sınıflar üretmek yerine fenotiplerde sürekli değişkenlik üretebilir (İnce ve Karaca 2019; Karaca vd. 2019).

2.3. DNA Metilasyonu

DNA sitozin metilasyonu daha çok tıbbi araştırmalarda yoğun olarak kullanılmakla birlikte son yıllarda bitkisel araştırmalarda da yaygınlaşmaktadır. Örneğin pamuk bitkisinde soğuk uygulamasıyla metilasyon paterni ve frekansı arasında ilişki tespit edilmiştir. Araştırmacılar soğuğun ve kuraklığın DNA sitozin seviyesini etkileyerek gen ifadesinin düzenlenebileceğini öne sürmüşlerdir (Fan vd. 2013; Bhardwaj vd. 2013; İnce ve Karaca 2019).

Pamuk lifinde diğer dokulara (fide yaprağı, olgun yaprak, kotiledon ve kökler) kıyasla DNA metilasyon seviyesi bilinmemektedir (Osabe vd. 2014). DNA metilasyonu, DNA'ya bir metil (CH₃) grubunun eklenmesiyle meydana gelen korunmuş kalıtsal bir epigenetik modifikasyondur (Tsafaris 2008). Çoğu kaynaktan elde edilen bulgular, yüksek organizmalarda gen ekspresyonunun kontrolünün DNA'daki sitozin metilasyonu ile ilişkili olduğunu ve metilasyon paterninin (deseninin) kalıtsal olduğunu göstermektedir. DNA hasarından kaynaklanabilen metilasyon kaybı gen ekspresyonunda kalıtsal anormalliklere yol açacaktır ve bunlar onkogeneze ve yaşlanmada önemli olabilecektir (Holliday 1987).

DNA metilasyonu transpoze edilebilir elementlerin (TE: Transpoze edilebilir elementler; genom üzerinde bir kromozomdan diğerine, aynı kromozom üzerinde bir bölgeden başka bir bölgeye yer değiştirebilen elementler) susturulması genom stabilitesi ve genomik imprinting için gerekli olan epigenetik bir modifikasyondur (Bartels vd. 2018).

DNA nükleotidleri metillenmesine rağmen bu metillenmelerden en yaygını DNA sitozin metilasyonudur. Sitozin metil transferaz enzimleri tarafından katalize edilen DNA sitozin metilasyonunda sitozin nükleotidine bir metil grubu eklenir (Kalisiz 2004). Epigenetik mekanizmaların bitki fonksiyonu için gerekli olduğu göz önüne alındığında, metilasyon yolları/yolakları kapsamlı keşif çabalarının hedefi olmuştur. Yapılan keşiflerin büyük bir çoğunluğu *A. thaliana* metilasyon mutantlarından örneğin DNA metilasyon 1 (*ddm1*) ve metil transferaz 1 (*met1*)'den gelmiştir (Diez 2014).

Bitkiler, gen ekspresyonu ve genom yapısı üzerindeki zararlı etkileri önlemek için epigenetik düzenlemeleri sabit tutmak ile yeni çevresel koşullara hızlı adaptasyon için gereken epigenetik varyasyonu oluşturmak için yeterince esnek tutmak arasındaki dengeyi sağlamalıdır. Bitkiler heterokromatik ve öökromatik hedef bölgelerinde metilasyon paternlerinin oluşturulmasından ve korunmasından sorumlu üç ayrı DNA metil transferaz türü içerir (Meyer 2010; Karaca vd. 2019).

Metilasyon varyasyonun genetik temeli oldukça karmaşık olmasına rağmen coğrafi orijin genom çapında DNA metilasyon seviyelerinin ve epiallellerin neden olduğu değişmiş gen ekspresyonunun ana belirleyicisidir. CG metilasyonu, DNA replikasyonu sırasında basit bir kopyalama mekanizması vasıtasıyla çoğaltılır, oysa CHG ve CHH metilasyonu kendi kendini güçlendiren halka ile korunur. DNA metilasyonundaki değişiklikler kendiliğinden de ortaya çıkabilir fakat çevresel ve genetik faktörler daha önemlidir. Uzun süre aynı yerde kalabilen uzantısız organizmalar olarak bitkilerin değişen ortamlara adaptasyon için DNA metilasyonundan yararlanması olasıdır. DNA metilasyonu gen ekspresyonunu etkileyebilir ve fenotiplerde görünmesi adaptasyon özelliklerinde ölçülebilir bir varyasyona sebep olabilir (Kawakatsu vd. 2016).

Bitkilerde DNA metilasyonunun abiyotik stres, genom katlanması, imprinting, çiçeklenme, vernalizasyon, introgresyonla ilişkilerini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (Zhao vd. 2008; Li vd. 2011).

Osabe vd. (2014) DNA metilasyon çeşitliği, genetik çeşitlilik ve metilasyon bağlamındaki değişiklikler, metilasyona duyarlı amplifiye polimorfizm (MSAP) analizleri kullanılarak bir metilasyon duyarsız enzim (*BsiSI*) kullandıkları çalışmada DNA metilasyon aracılı gen regülasyonunun pamukta fenotipik çeşitliliğe ve gelişmeye potansiyel katkısını, pamuk genotipleri ve çeşitli dokular arasında araştırmışlardır ve DNA metilasyonundaki farklılıklar seçilen pamuk genotiplerindeki genetik çeşitlikten hatta lif özelliklerinin de dâhil olduğu dokular arasında önemli ölçüde farklı DNA metilasyon seviyeleri olduğu sonucuna varmışlardır.

Pamuk genotiplerinde daha yüksek DNA metilasyon çeşitliliği (CG metilasyonundan daha fazla çeşitlilik gösteren CHG metilasyonu) epigenetik düzenlemenin pamuk için önemli olabileceğini ve lif ile diğer dokular arasındaki DNA metilasyonundaki değişiklik bazı genlerin lif gelişimi için epigenetik olarak düzenlenebilmesinin olası olduğunu ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (Karaca vd. 2019).

2.4. Histon Modifikasyonları

Histonlar, DNA paketlenmesinden sorumludurlar. Yüksek miktarda pozitif yüklü amino asit içeren (lizin ve arjinin) içeren histon proteinleri eksi yüklü DNA'ya sıkı bir şekilde bağlanır (Can ve Aslan 2016). Gen ekspresyonunu düzenlemek için kromatini değiştiren çoklu epigenetik mekanizmalar arasında histon modifikasyonları önemli bir rol oynar. *Arabidopsis*'teki son çalışmalar, ilk genom çapında histon modifikasyon haritalarını sağlamış, histon modifikasyonları için önemli biyolojik rolleri ortaya çıkarmış ve histon modifikasyonlarında uyarana bağlı değişiklikler anlayışımızı geliştirmiştir (Pfluger ve Wagner 2007). Ayrıca, Smulder ve De Klerk (2011) bitki doku kültüründe oluşan varyasyonun DNA ve histon metilasyonu ve histon deasetilasyonundan kaynaklandığını belirlemişlerdir.

2.5. RNA İnterferans (RNAi)

RNA interferans (RNAi), çift zincirli RNA'nın (dsRNA; double stranded RNA) transkripsiyon sonrası gen ifadesinin düzenlenmesinde kullanılan mekanizmadır. Transkripsiyon sonrası gen susturma ("post-transcriptional gene silencing") olarak tanımlanan RNAi hücreye giren çift zincirli RNA'nın homoloğu olan mRNA zincirine bağlanarak o geni susturur (Aras vd. 2015). Bu bağlamda RNAi aslında RNA aracılığı ile gen aktivitesinin düzenlenmesini kapsar. Organizmaların gen aktivitelerini, hangi genin ne şekilde ifade edileceğini, genin aktivasyonunu veya inaktivasyonunu kontrol eden bir sistem olan RNAi Andrew Z. Fire ve Craig C. Mello tarafından keşfedilmiş ve bu iki bilim insanına keşiflerinden dolayı 2006 yılında Nobel bilim ödülü verilmiştir (Karaca ve Ince 2011a).

2.6. Epigenetik Markırlar

Tüm epigenetik bilgilerin toplamı epigenom olarak adlandırılır. Epigenetik olguların biyolojik ve biyomedikal önemini anlamak için, epigenomun ayrıntılı bir şekilde haritalandırılması önemlidir. Ancak genomun aksine epigenom hücreler arasında son derece farklıdır ve tek bir hücre içinde bile koşullara göre zaman içerisinde dalgalanmalar gösterir. Bu nedenle en az hücre tiplerinin sayısı kadar epigenom vardır (Suzuki ve Bird 2008).

2.7. Metilasyon Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi (MSAP)

Metilasyon Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfizm (MSAP) yöntemi çoğu araştırmacının epigenetik varyasyon çalışmalarında özellikle faydalı olan kolay, güvenilir ve nispeten daha ucuz olduğu için kullanılmaktadır. Özellikle *MspI* ve *HpaII* izoşizomer enzimleri kullanıldığında bu yöntem tarafından üretilen elektroforetik modellemelerin yorumlanması, bu enzimlerin metilasyona duyarlı olması ve CCGG tanıma motifine sahip herhangi bir C nükleotinin bitki DNA'sında metillenebilmesinden dolayı zordur (Fulnecek ve Kovarik 2014).

Zhao vd. (2008) MSAP yöntemi kullanarak pamuk heterotik melezleri ve heterojen olmayan melezler ile ve ebeveyn hatları arasındaki farklılıkları ve fide aşamasından çiçeklenme aşamasına kadar metilasyon seviyesindeki değişimleri araştırmışlar ve araştırma sonucunda yüksek oranda heterotik melezlerdeki

demetilasyon lokuslarının sayısının, düşük oranda heterotik melezlerden daha fazla olduğunu ve fide aşamasında pamuktaki DNA sitozin metilasyon seviyesinin çiçeklenme aşamasından daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

2.8. PCR İçin Primerlerinin Tasarlanmasında Kullanılan Ağ Tabanlı Programlar

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), biyomedikal araştırma, tıp ve adli tıp, tarım, çevre, veterinerlik ve gıda bilimleri gibi birçok alanda ilgili DNA amplifikasyonu için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Ye vd. 2012). Modern biyoloji çağından doğan bir teknoloji olan PCR için kullanılan enzim 10X tampon çözelti ("buffer") ile birlikte verilen *Taq DNA polimeraz*, klonlanmış bir ürün olarak saflaştırılır, nükleotit trifosfatlar ultra saftır, tamponlanır ve uygun bir konsantrasyonda bulunur. Ancak, ticari olarak elde edilebilen bu başlangıç materyallerinin tümü ile PCR, özellikle deneyimsiz araştırmacılar için başarısız olmaktadır. Bütün reaktiflerin uygun miktarda eklendiği varsayıldığında iki kritik PCR bileşeni araştırmacının seçimlerine bırakılır bunlardan biri yeterli kalitede olması ve *Taq DNA polimeraz* inhibitörü içermemesi gereken kalıp nükleik asit iken, ikincisi oligonükleotit primerlerinin seçilmesidir. Bu işlem genellikle bir PCR deneyinin genel başarısı için kritiktir, fonksiyonel bir primer seti olmadan PCR ürünü olmayacaktır (Dieffenbach vd. 2011).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), etkinliği ve hassasiyeti büyük ölçüde ilgili bir gen ya da DNA fragmanının amplifikasyonu için kullanılan primerlerin verimliliğine bağlı olan enzimatik bir reaksiyondur (Kumar ve Chordia 2015). En uygun primer sekansı ve primer konsantrasyonu, PCR'ın maksimum özgüllüğü ve verimliliği için gereklidir. İyi tasarlanmamış bir primer veya primer çiftleri, spesifik olmayan amplifikasyon ve/veya primer-dimer oluşumu nedeniyle çok az ürünle sonuçlanabilir ya da ürün oluşumunu baskılayacak derecede rekabetçi hale gelebilir.

Etkili PCR primerlerinin tasarımı için birkaç çevrimiçi araç vardır. Bu araçlardan bazıları Çizelge 2.1 gösterilmektedir. Bu araçlardan bazıları "CODEHOP", "Gene Fisher", "DoPrimer", "Primer 3", "Primer Selection", "Web Primer", "PCR Designer", "Primo Pro 3.4", "Primo Degenerate 3.4", "Eprimer3", "PRIMO", "PrimerQuest", "MethPrimer" ve "Rawprimer" bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır (Abd-Elsalam 2003).

Çizelge 2.1. Primer tasarlamak amacıyla kullanılan bazı programlar (Abd-Elsalam 2003)

Program	Açıklama
CODEHOP	Dejenere PCR primer tasarımı yapar hizalanmamış dizileri kabul eder.
Gene Fisher	Standart veya dejenere primerler için etkileşimli primer tasarım aracıdır hizalanmamış dizleri kabul eder.
DoPrimer	PCR ve DNA sekanslama için primerleri kolayca tasarlar.
Primer3	Kapsamlı PCR primeri ve hibridizasyon probu tasarım aracı; birçok seçenek sunar; ancak başlangıçta varsayılanları kabul etmek kolaydır.
Primer Selection	Nükleotit sekansından PCR primerleri seçilmesidir.
Web Primer	PCR veya sekanslama amacıyla alternatif primerlerin tasarımına izin verir.
PCR Designer	Sekans mutasyonlarının kesim analizi
Primo Pro 3.4	Rastgele primer alma olasılığını azaltarak PCR gürültüsünü azaltır.
Primo Degenerate 3.4	Primo Degenerate 3.4 tek bir peptit sekansına veya proteinlerin nükleotitlerin çoklu hizalanmalarına dayanan PCR primerlerini tasarlar.
PCR Primer Design	PCR veya sekanslama amaçlı primerler tasarlayan bir uygulamadır.
The Primer Generator	Program, orijinal nükleotit sekansını ve istenen amino asit sekansını analiz eder ve yeni bir restriksiyon enzim alanına sahip olan veya eskisi eksik olan bir primer tasarlar.
Eprimer3	PCR primerlerini ve hibridizasyon oligolarını (EMBOSS) alır.
PRIMO	İleri ve geri oligonükleotid primerlerin tahminini yapar.
PrimerQuest	Primer tasarım aracıdır.
MethPrimer	Metilasyon PCR'leri için primerleri tasarlar.
Rawprimer	PCR primerlerinin seçimi için bir araçtır.
MEDUSA	PCR primer çiftlerinin otomatik seçimi ve görsel değerlendirmesi için bir araçtır.
The Primer Prim'er Project	PCR primer tasarım sürecini tamamen otomatikleştiren yazılım paketidir.
Oligonucleotides for the PCR	Bir alanın her iki tarafında oligonükleotidler aranmasına olanak sağlar.
GAP	Genom çapında otomatik primer bulma sunucusudur.

Diğer çevirim içi araçlardan biri olan Primer-Blast ile kullanıcılar hem yeni bir primer tasarlayabilir hem de önceden var olan primerlerin spesifikliğini kontrol edebilir. Primer-Blast küresel bir alaymınt (hizalama) mekanizması içerir ve potansiyel amplifikasyon hedeflerini belirlemede çok hassas olacak şekilde tasarlanmıştır. Primer-BLAST ayrıca ekson/intron lokasyonlarına dayalı primerlerin yerleştirilmesini ve primerlerde tek nükleotit polimorfizm (SNP) bölgelerinin hariç tutulmasını destekler (Ye vd. 2012).

RExPrimer PCR primer tasarımı için birçok işlevsellik sağlar. Farklı veri tabanları, SNP (Single Nucleotide Polymorfizm, Tek Nükleotit Polimorfizm) veritabanı, insersyon ve delasyon (indel) polimorfizm veritabanı, pseudogene veritabanı ve yapısal genomik varyasyon veri tabanı RExPrimer'e bütünleşmiştir ve elde edilen primerlerin internet sitesinden ayrılmadan etkin bir biçimde doğrulanması sağlanmıştır. Bu veritabanlarını dâhil ederek, RExPrimer tarafından rapor edilen primerler, ilgili dizilere (örneğin psödojen, segmental duplikasyon) yanlış hazırlanmayı ve yapısal polimorfizmler (SNP, indel ve kopya sayısı varyasyonu (CNV)) nedeniyle olası PCR başarısızlığını önler (Piriyaongsa vd. 2009).

Primer 3 programı yaygın olarak kullanılan bir araç haline gelmiştir. Bu program kullanılarak hedef bölgelerin, intron, ekson, promotör, kodlayan gen bölgesi, 5'UTR ya da 3'UTR kısımları içermemesine özen gösterilerek tasarım gerçekleştirilebilmektedir. Primer 3'ün ilk versiyonu bir DNA sekansının tespiti için primerler, hibridizasyon oligonükleotitleri seçmek için ve mikrosatalit genotipleme için PCR denemelerinin tasarımı için geliştirilmiştir. Bir DNA dizisi şablonu verildiğinde Primer 3 kabul edilebilir primer çiftlerini ve primerleri değerlendirir daha sonra sonra en düşük cezaya sahip çiftlerini verir.

Primer 3'ün popüleritesi, nispeten kolay kullanımlı bir web hizmetinin mevcudiyeti, sağlam mühendislik, program kaynak koduna açık erişim, genom ölçekli araştırmalar için yüksek verimli iletişim kanallarını kullanıma uygunluk ve kolaylık gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Untergasser vd. 2012).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. *In Silico* Yöntemler

3.1.1. Hedef gen elementlerinin tespiti

In silico çalışmalarda kullanılmak amacıyla GenBank (National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanından tamamı *Gossypium hirsutum* ve *Gossypium barbadense* genomlarına ait olan genler Fasta formatında kişisel bilgisayarlara indirilmiş ve indirilen pamuk genlerine ait diziler bu çalışma kapsamında kullanılmıştır. Gen dizileri ilk analizinde birimimizde geliştirilmiş olan EpiOne yazılım programı (Karaca ve Ince 2016) kullanılarak yaklaşık otuz adet gende 40 gen elementi tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan gen elementleri olarak düzenleyici diziler olan promotör dizileri ve gen uç kısımları olan translayona alınmayan diziler olan 5'-UTR ve 3'- UTR ile intron ve ekson kısımlarından oluşmaktadır.

Gen elementleri dizileri üzerindeki CG, CHG ve CHH dizileri EpiOne yazılım programı kullanılarak tespit edilmiştir (Karaca ve Ince 2016). GenBank verilerinde gen elementleri bilgilerinin bulunması nedeniyle EpiOne yazılım programı kullanımı bu çalışmada opsiyonel olarak alınmıştır. Sadece türlerden biri için kullanılmış diğer tür için GenBank gen element bilgileri dikkate alınmıştır.

3.1.2. Gen elementlerinde restriksiyon enzim tanıma dizilerinin tespiti

GenBank veri tabanından Batch Entrez opsiyonu kullanılarak toplu bir şekilde Fasta formatında indirilen gen element dizileri birimimizde bulunan Sequencher 4.9 yazılım programı kullanılarak *MspI* ve *HpaII* restriksiyon enzimi tanıma dizilerini içeren gen element dizilerinin tespiti yapılmıştır. İndirilen 100 genin 88'inden *MspI* ve *HpaII* enzim kesim bölgesi olan CCGG dizilerinin varlığı belirlenmiştir.

3.1.3. Gen elementleri için primer dizilerinin belirlenmesi

Çalışmada metilasyon yoğun dizilerin amplifikasyonlarını gerçekleştirilmesinde kullanılacak primer çiftleri Primer 3 (Version 0.4.0) primer belirleme programı kullanılarak *Gossypium hirsutum* için 44 primer çifti, *Gossypium barbadense* için 44 primer çifti olmak üzere toplamda 88 adet primer çifti belirlenmiştir. Bu primer çiftleri AS olarak adlandırılmıştır.

Primer çiftleri belirlenirken daha önce Ince (2010) tarafından kullanılan temel kriterler modifiye edilerek kullanılmıştır:

İlk ölçüt primerlerin uzunluğu ile ilgili olup minimum 20, optimum 24 ve maksimum 26 baz arasında değişen primer uzunluğu kullanılarak primer tasarımı gerçekleştirilmiştir.

Tasarlanan primerlerin PCR çalışmalarında annealing sıcaklığının tespitinde kullanılmak üzere erime sıcaklığı olan T_m için minimum 58 °C optimum 60 °C ile

maksimum 62 °C arasında tutulmuş ve iki primer arasındaki maksimum sıcaklık farkının 1 °C'den fazla olmaması sağlanmıştır.

PCR ürün uzunluğu aralığı (amplikon büyüklüğü) 100-1000 bp olarak seçilmiş; ancak ürün büyüklüğünün 100 bp az ve 970 bp fazla olmasına izin verilmemiştir. Geniş ürün boyu yelpazesi kullanılarak primerlerin ileriki çalışmalarda multipleks PCR çalışmalarında da kullanılması sağlanmıştır.

Dizayn edilen primer setlerinin %G/C oranı ise minimum %40 optimum %50 maksimum %60 arasında değişim aralığında tutulmuştur. Primer tasarımı için G/C oranının yüksek tutulmasıyla primerin renatürasyon sıcaklığı doğru orantılı olarak yüksek olacağından PCR etkinliği artırılmış ve gerçek olmayan ürünlerin elde edilme olasılığı azaltılmıştır.

Dizayn edilen primerler için diğer bir önemli kriter ise dizayn edilen primerlerin kendi üzerinde komplementeri (tamamlayıcı) olmayan sekanslardan yararlanmaktır. Bu çalışmada kullanılan primerler için en fazla 4 bazın aynı primerde komplementeri riski (sekonder DNA yaplanması) göze alınmıştır.

Dizayn edilen primer çiftlerinin birbiri üzerinde komplementer sekanslar bulundurma olasılığı 2 baz olarak sınırlandırılmıştır. Bu değerin üzerinde yine primer dimer oluşturma riski bulunmaktadır. Bu çalışmada bir primer üzerinde en fazla 4 bazın komplementerisine bağlanabilmesine izin verilmiştir.

3.2. In Vitro Yöntemler

3.2.1. Bitki materyali

Pamuk (*Gossypium* L.) dünyada önde gelen doğal lif bitkisidir. Çalışmada *G. barbadense* Pima 3-79 ve *G. hirsutum* türleri Texas Marker-1 (TM-1) çeşitleri ile temsil ettirmek üzere bu çeşitler yetiştirilmiştir. Olgun bitkilerden tek tohum kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu çeşitler kendi türleri için genetik ve sitogenetik standart çeşitlerdir. TM-1 Deltapine çeşidinden türetilmiştir. TM-1 verimli iken lif kalitesi yönünden Pima 3-79'u geçecek düzeyde değildir (Kohel vd. 2001). Kullanılan çeşitlerin standart çeşitler olmasından dolayı farklı araştırmacılar tarafından elde edilen verilerin karşılaştırılmasında kolaylık sağlamaktadır. Örneğin GenBank veri tabanlarında bu çeşitlere ait genom dizileri bulunmaktadır. Ayrıca bu çeşitler gerek markır geliştirmeye çalışmalarında panel genotipi ve gen fonksiyonlarının belirlenmesinde de standart genotiplerdir.

3.2.2. DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu, yapılırken Karaca ve İnce tarafından Akdeniz Üniversitesi'nde geliştirilip patenti alınmış olan Genomik DNA İzalasyon kiti kullanılmış ve kit protokolü uygulanmıştır. Kit içeriğiyle ilgili bilgi Patent nedeniyle bilinmemektedir.

1. Tek pamuk tohumu alüminyum folyo içerisine sarılmış ve havaneli yardımıyla tohumun üzerine vurulmuştur. Daha sonra tohum alüminyum folyodan çıkartılmış ve tohum kabuğu soyulup tekrar alüminyum folyoya sarılarak tohumun havaneli ile iyice ezilmesi sağlanmış ve 2 mL'lik temiz bir ependorf tüpün içine alınarak üzerine 20 µL Proteinaz K ve daha önceden 65 °C'de bekletilmiş olan 500 µL M1 solüsyonu eklenmiş ve örnekler 30'ar saniye vortekslenmiştir.
2. Bu işlemten sonra örnekler 20 dk. 65 °C'de sıcak su banyosunda bekletilmiş ve her 10 dk.'da bir vorteks yapılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından 65 °C'den alınan örneklerin üzerine 10 µL RNaz A eklenmiş ve homojen bir karışım oluşturması için tekrardan vortekslenmiş ve ependorf tüp içerisindeki örnekler 65 °C sıcak su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir.
3. 65 °C'den alınan örneklerin üzerine önceden ısıtılmış olan M2 solüsyonundan 250 µL eklenmiş vorteks edildikten sonra tekrar 65 °C'de 10 dk. bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda sıcak su banyosundan alınan örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten ya da buz üzerinde soğutulduktan sonra üzerine 500 µL kloroform eklenmiş ve vortekslenmiştir.
4. Yapılan vorteks işleminin ardından örnekler 12000xg'de 10dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda oluşan üst faz (süpernatant) dikkatli bir şekilde steril 2 µL'lik ependorf tüpe alınmış üzerine alınan hacim kadar M3 solüsyonu ve alınan hacim kadar %100 etanolden eklenmiş örnekler ters yüz edilerek karıştırılmış ve DNA yoğunlaşması olmaması amacıyla kısa bir vorteks yapılmıştır.
5. Bu işlemin ardından oluşan karışımdan 700 µL silika kartuşlu tüplere (SKT) alınmış ve 11000 xg'de 1 dk. santrifüj edilip kartuşun alt kısmında kalan solüsyon dökülmüştür. Bu işlem tüpte kalan karışım için aynı şekilde tekrarlanmıştır.

6. 500 µL M4 solüsyonu SKT üzerine eklenmiş ve tüpler 11000 xg'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüjden alınan örneklerin alt kısmında kalan solüsyon dökülmüş ve SKT üzerine 680 µL M5 solüsyonu eklenmiş daha sonra 11000 xg'de 1 dk. santrifüjlendikten sonra alınan örneklerin altında kalan solüsyon dökülmüştür.
8. Aynı işlem santrifüjden alınan örnekler için tekrarlanmış fakat bu sefer SKT üzerine 680 µL M6 solüsyonundan eklenmiş ve örnekler 11000 xg de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüjden alınan örnekler altında kalan solüsyon dökülmüş ve örnekler boş bir şekilde 1 dk boyunca santrifüj edilmiştir.
10. Bu işlemin ardından steril 1.5 µL'lik tüplere alınan SKT üzerine 65°C'de bekletilmiş olan M7 solüsyonundan 200 µL eklenmiş ve 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona tabi tutulmuştur.
11. Bekleme süresi sonunda örnekler 11000 xg'de 10 dk santrifüj edilip çözünmesi sağlandıktan sonra genomik DNA örnekleri örnekleri -20 °C'de ya da +4 °C'de bilimsel çalışmalarda kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.2.3. DNA miktarı ve saflığının belirlenmesi

DNA miktarı ve saflığını belirlemek için iki ayrı yöntem kullanılmıştır. Bunlardan ilki spektrofotometre yöntemi ikincisi ise agaroz jel elektroforez yöntemidir.

3.2.3.1. Spektrofotometre yöntemi

Bu yöntemde DNA izolasyonu tamamlanmış olan genomik DNA'ların miktarını ve saflığını belirlemek için spektrofotometre cihazı kullanılmış ve izole edilen DNA'lar:

$$\text{Seyreltme Faktörü} = [(\text{Seyrelen} + \text{Seyreltilen}) / \text{Seyrelen}] \quad (3.1)$$

Formülü yardımıyla hesaplanmıştır. Örneklerden 50 µL genomik DNA alınarak 450 µL su kullanılarak 10 kat seyreltilmiştir. Spektrofotometre cihazı ile DNA'nın 200-nm ile 300 nm arasındaki dalga boylarındaki absorbe ettiği ışın miktarına bakılmıştır. Her bir örnek için A_{230} , A_{260} , A_{280} değerleri için spektrofotometre okumaları gerçekleştirilmiştir.

DNA'nın miktar ve kalitesini belirlemek için ise A_{260}/A_{280} , $A_{260}/230$ değerleri kullanılmıştır. Saf DNA yaklaşık 1.8 değerini vermelidir. 230 nm'de görülen absorpsiyon, örneğin karbonhidratlar, peptitler, fenoller veya diğer aromatik bileşenler gibi maddelerle kontaminasyonu göstermektedir (Karaca vd. 2005).

Stoktaki DNA konsantrasyonunu belirlemek için:

$$\text{DNA konsantrasyonu (ng/µL)} = (A_{260} \times \text{seyreltme faktörü} \times 50 \text{ (DNA için varolma katsayısı)}) \quad (3.2)$$

formülü kullanılmıştır.

Ana stok DNA'dan 20 ng/ μ L DNA içeren çalışma solüsyonu kullanılmıştır.

3.2.3.2. Agaroz jel elektroforez yöntemi

Geleneksel jel elektroforez yöntemleri, DNA örneklerinin katı matrikse (en yaygın agaroz ya da poliakrilamit) yerleştirilmesi ve jel içindeki moleküllerin statik elektrik alanında göç ettirilmesiyle gerçekleşmektedir (Birren ve Eric 1993). Bu çalışmada yüksek moleküler ağırlıktaki DNA'nın varlığı, elde edilen DNA'da polisakkarit olup olmadığı, DNA'da RNA kalıntısının varlığını tespit edebilmek için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen genomik DNA'nın kalitesini belirlemek için %1'lik agaroz jel 1X TBE kullanılarak mikrodalga fırında hazırlanmıştır (Karaca ve Ince 2017).

Jel içerisinde 0.5 μ g/mL konsantrasyonda olacak şekilde 10 mg/mL stoktan etidium bromit ilave edilmiştir. DNA örnekleri 500 ng hazırlanmış ve 1/6 örnek hacmi olacak şekilde 6X DNA yükleme çözeltisi ile karıştırılmıştır. DNA örnekleri jel kuyucuklarına yüklenmiş ve 1X TBE çözeltisi kullanılarak 5V/cm uygulanmış ve 120 dakika süre ile yürütülmüştür (Aydın 2018).

Genomik DNA'nın kalitesini belirlemek amacıyla 30'luk jel istasyonunda %1 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp hacim 1X Tris, Borik asit, EDTA (TBE) TBE çözeltisi kullanılarak 30 μ g/mL'ye tamamlanmış ve çözelti mikrodalga fırında hazırlanmıştır. Agaroz çözeltisi mikrodalga fırından çıkartıldıktan sonra içerisinde baloncuk oluşmamasına dikkat edilerek bir miktar soğutulmuş ve üzerine çözelti içerisinde 0.5 μ g/mL konsantrasyonda olacak şekilde 10 mg/mL stoktan etidium bromit ilave edilerek hazırlanmıştır.

Ethidyum bromit jel içerisinde homojen bir şekilde dağıtıldıktan sonra katılaşmadan jel tankı üzerine dökülmüş ve uygun taraklar jel katılaşmadan koyularak jelin üzerinde kuyucukların oluşması sağlanmıştır. Yaklaşık 40 dk sonra jel donmuş ve taraklar dikkatli bir şekilde çıkartılmıştır. DNA örnekleri 5 μ L yükleme çözeltisi 8 (bromo fenol blue) ile karıştırılmış ve oluşan jel kuyucuklarına ayrı bir örnek yüklenmiştir.

Örnekler 1X TBE çözeltisi kullanılarak ve 5 V/cm elektrik akımı verilerek, 60 dk süresince elektriksel alanda yürütülmüştür. Bu sürelerin sonunda elektroforez tankından alınan jel UV (Ultra Viole) ışık altında incelenmiş ve jel görüntüleri UVpro programı ile bilgisayar ortamında kaydedilmiş yardımıyla fotoğraflanmıştır.

3.3. Genomik DNA Örneklerinin Normalleştirilmesi ve Konsantrasyonu

200 µL’de çözdürülen gDNA örnekleri her bir µL’de 120 ng DNA olacak şekilde normalleştirilmiştir. Çizelge 3.1’de normalleştirme işlemi için her iki pamuk çeşidi DNA hacim ve miktarları gösterilmektedir.

Konsantrasyon hesabı yapıldıktan sonra

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (3.2)$$

denklemini kullanılarak var olan 200 ng’lık ana stoktan alınması gereken DNA miktarları bulunmuştur.

Çizelge 3.1. Genomik DNA örneklerinin normalleştirilmesi ve konsantrasyonu

Çeşit	Konsantrasyon	1X µL	10X µL	H ₂ O	Hacim
TM-1	192 µg/mL	1.04	11	18.5 µL	30
Pima 3-79	105 µg/mL	1.9	19	10.5µL	30

DNA konsantrasyon hesabı formülünden yola çıkarak TM-1 için 192 µg/ml Pima 3-79 için 105 µg/mL konsantrasyon hesaplanmıştır. Normalleştirme hesabı yapılırken toplam 30 µL hacimde her bir µL’de 200 ng DNA olacak şekilde hesaplama yapılmış ve 2 µL’lik tüplere 10X için 11 µL TM-1 genomik DNA’sı 18.5 µL PCR ayarı su ve 19 µL Pima 3-79 genomik DNA’sı ve 9.5 µL PCR ayarı su eklenmiştir.

3.4. Genomik DNA Örneklerinin *MspI* ve *HpaII* Enzimleri İle Kesilmesi

Restriksiyon enzimleriyle kesim işleminde normalleştirilmesi yapılan örneklerin üzerine toplam 35 µL hacimde 1X olacak şekilde 10X enzim bufferi ve her bir µL’de 10 ünite olacak şekilde 20’şer ünite 5’-C↓CGG-3’ / 3’-GGC↑C-%’ tanıma bölgesi olan *MspI* ve *HpaII* enzimleri için hesaplama yapılmış ve örneklerin üzerine toplam 5.5 µL enzim ve buffer eklenmiştir ve örnekler 37 °C’de en az 16 saat boyunca bekletilmiştir. Final hacim 200 µL steril PCR ayarı su eklenmiş ve PCR işleminden önce iyice karıştırılmaları sağlanmıştır.

3.5. Hedef Lokusların Restriksiyon Enzimleriyle Kesiminin Kontrol Edilmesi

MspI ve *HpaII* enzimleriyle kesim işlemi yapılan her bir örnek primerler veya primer çiftleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu uygulanmıştır. Daha sonra enzimle muamele edilen örnekler ve edilmeyen örnekler birbirleriyle karşılaştırılmış ve yapılan kontrolde enzim kesim çalışmalarının başarılı olduğu bulunmuştur (Uygur Göçer 2018).

3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

GS-KUP yöntemi tekli ve/veya çoklu olarak uygulanmıştır. Özetle enzim kesimlerine tabi tutulan örnekler yan-yanaya olacak şekilde yüksek bağlanma sıcaklığına sahip PZR ile çoğaltılmıştır (Xu vd. 2013; Karaca vd. 2016).

3.6.1. PCR Protokolü

Final hacmi 25 µL'ye ayarlanmış olan PCR işleminde içinde 200 ng *MspI* ve *HpaII* enzimleriyle kesilmiş olan genomik DNA'dan (5 µL), birimimizde bulunan ve bu çalışmada uygulanan yöntemlerle belirlenmiş olan primer çiftlerinden 0.5 µM, 12 mM Tris-HCl (pH: 9.1) 60 mM KCl, %0.012 Triton X-100, 2-3 mM MgCl₂, 0.28 mM dNTP ve 1 Ünite *Taq* DNA polimeraz kullanılarak hazırlanan PCR solüsyonunda gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.2'de Gen Spesifik Kesilmiş Amplifikasyon Polimorfizm Yönteminde PCR'de kullanılan kimyasallar ve bu kimyasalların kullanım miktarları verilmiştir.

Çizelge 3.2. Gen spesifik kesilmiş amplifikasyon polimorfizm yönteminde PCR'da kullanılan kimyasallar ve kullanım miktarları

Kullanılan Kimyasallar		Stok	Miktar	Final
Genomik DNA			5 µL	200 ng
Steril H ₂ O			8.75 µL	
İleri Primer ("Forward")		20 µL	0.625 µL	0.5 µM
Geri Primer ("Reverse")		20 µL	0.625 µL	0.5 µM
Steril- H ₂ O			4.4 µL	
10X Reaksiyon Çözeltilisi	Tris HCl (pH 9.1)	100 mM		12 mM
	KCl	500 mM	3 µL	60 mM
	Triton X-100	% 0.1		% 0.012
MgCl ₂		50 mM	1.5 µL	3 mM
DNTP		10 mM	0.7 µL	0.28 mM
<i>Taq</i> DNA Polimeraz		2.5 ünite/ µL	0.4 µL	1 ünite
Toplam Hacim			25 µL	

G. hirsutum (TM-1) ve *G. barbadense* (Pima 3-79) genomik DNA'ları kullanılarak, birimde daha önce dizayn edilen 6 primer çiftine uygulanmış ve Çizelge 3.3'de verilen PCR profili kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. PCR amplifikasyon profili

PCR Profili		Zaman	Döngü Sayısı	Aşama
Hot start	94 °C	4 dk	1 döngü	Ön denatürasyon
	94 °C	30 sn		Denatürasyon
Ön PCR	60 °C → 55 °C	30 sn	10 döngü	Renatürasyon
	72 °C	1 dk		Sentez
	94 °C	30 sn		Denatürasyon
PCR	55 °C	30 sn	30 döngü	Renatürasyon
	72 °C	1 dk		Sentez
Final	72 °C	10 dk	1 döngü	Final sentez

Hedef lokuslarının çoğaltımı için PZR profilinde spesifik olmayan amplifikasyonların oluşumunu önlemek amacı ile indirgemeli PZR (“touch-down PCR”) profili kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Bu yöntemle başlangıçtaki 10 döngüde asıl reaksiyonun devam ettiği renatürasyon sıcaklığından en az 5 °C yüksek sıcaklıkla primer çiftinin çoğaltılan DNA sarmallarına bağlanması sağlandıktan sonra her döngü başına renatürasyon sıcaklığı 0.5 °C düşürülmüştür. İndirgemeli PZR profilleri uygulamaları ile PZR çalışmalarında spesifik olmayan bölgelerin amplifikasyonları önlenmeye çalışılmıştır (İnce 2010).

3.7. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi

PCR işleminden sonra örnekler *MspI* ve *HpaII* enzimleriyle yapılan uygulama sonucu oluşan farklılıkları tespit edebilmek amacıyla agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve oluşan bant farklılıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Uygulanan işlemlerin sırası şu şekildedir: Enzimlerle kesim işleminde meydana gelen farklılıkları belirlemek için 50 mL’lik jel istasyonu kullanılmış ve %3 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp üzeri 1X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) çözeltisi kullanılarak 50 mL’ye tamamlanmış ve mikrodalga fırında çözülerek hazırlanmıştır.

Agaroz çözeltisi mikrodalga fırından çıkartıldıktan sonra içerisinde baloncuk oluşmamasına dikkat edilerek bir miktar soğutulmuş ve üzerine çözelti içerisinde 0.5 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde 5 µL 10 mg/mL stoktan etidium bromit ilave edilerek hazırlanmıştır. Ethidyum bromit jel içerisinde homojen bir şekilde dağıtıldıktan sonra katılaşmadan jel tankı üzerine dökülmüş ve uygun taraklar jel katılaşmadan koyularak jelin üzerinde kuyucukların oluşması sağlanmıştır.

Yaklaşık 40 dk sonra jel donmuş ve taraklar dikkatli bir şekilde çıkartılmıştır DNA örnekleri 500 ng hazırlanmış ve 1/6 örnek hacmi olacak şekilde hazırlanan 6X DNA yükleme çözeltisi ile karıştırılmıştır. İki farklı enzimle muamele edilen DNA örnekleri jel kuyucuklarına 10 µL olarak yan yana yüklenmiştir.

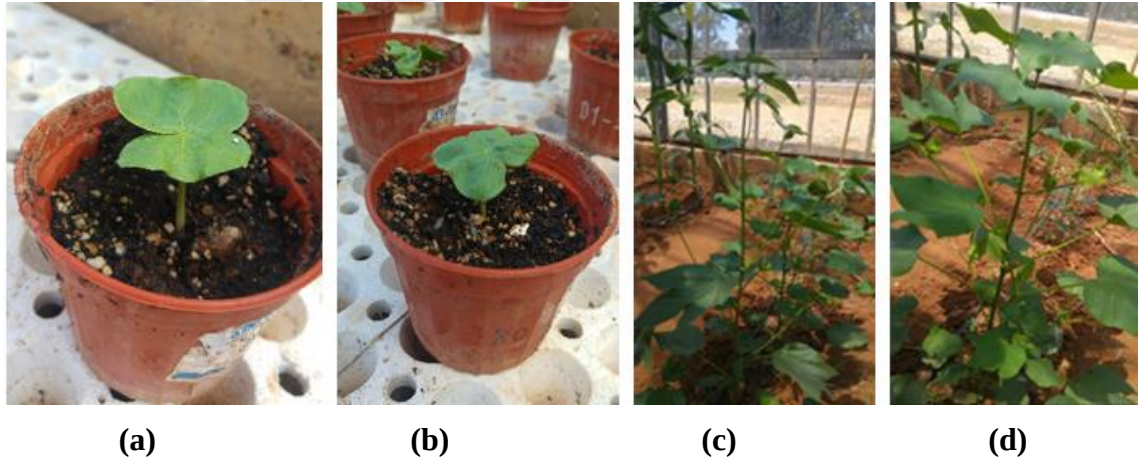
Örnekler 1X TBE çözeltisi kullanılarak ve 70 volt elektrik akımı verilerek, değişen sürelerde ile elektriksel alanda koşturulmuştur. Bu sürelerin sonunda elektroforez tankından alınan jel Ultra Viole (UV) ışık altında incelenmiş ve elektriksel alanda hareket sonucu oluşan jel görüntüleri UVpro programı ile bilgisayar ortamında kaydedilmiş yardımıyla fotoğraflanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali

Bu çalışmada *G. hirsutum* genomuna ait olan TM-1 ve *G. barbadense* türüne ait olan Pima 3-79 çeşitleri kullanılmıştır. Kullanılan çeşitler Akdeniz Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü tarla ve seralarında yetiştirilmiş ve bu çeşitlerin tohumlarından DNA izolasyonu yapılmıştır. Çalışmada Deltapine 14 çeşidinden elde edilen ve Texas A&M Üniversitesinde 40, Mississippi State Üniversitesinde 4 ve Akdeniz Üniversitesinde 2 kez olmak üzere toplam 46 generasyon kendilenmiş olan Texas Marker-1 (TM-1, *G. hirsutum*) ve çift haploid (“double-haploid”) bir hat çeşiti olan Pima 3-79 (*G. barbadense*) kullanılmıştır (Şekil 4.1).

Bu tez çalışmasında da kullanılmış olan bitki materyali pamuk genetik çalışmalarında standart olan, genetik ve morfolojik özellikleri iyi bilinen çeşitlerdir. Standart çeşitler olmaları nedeniyle farklı araştırmacılar tarafından elde edilen verilerin karşılaştırılmasında kolaylık sağlamaktadır. Örneğin GenBank veri tabanlarında bu çeşitlere ait genom dizileri bulunmaktadır. Ayrıca bu çeşitler gerek markır geliştirmeye çalışmalarında panel genotipi ve gen fonksiyonlarının belirlenmesinde de standart genotiplerdir.

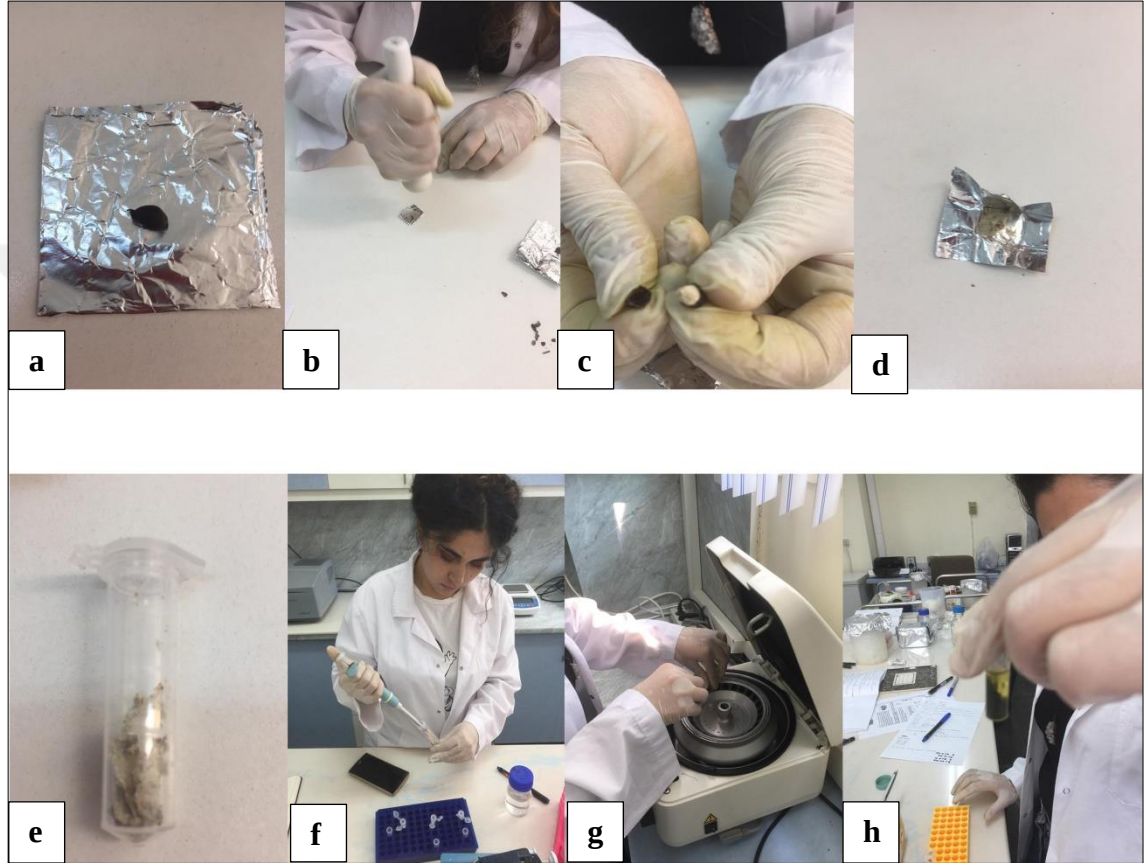


Şekil 4.1. Saksı ve sera koşullarında yetiştirilen pamuklar **a)** *Gossypium hirsutum* saksıda; **b)** *Gossypium barbadense* saksıda; **c)** *Gossypium hirsutum* sera koşullarında; **d)** *Gossypium barbadense* sera koşullarında

4.1.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyon çalışmalarında daha önce yetiştirilmiş olan bitkilerin kütlülerinden toplanmış olan TM-1 ve Pima 3-79 tohumlarından rastlantısal olarak seçilen tohumlar kullanılmıştır. Çalışmada tek tohumdan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan tohumlar hassas terazi yardımıyla ölçülmüş ve ağırlıklarının 70 miligram ile 110 miligram arasında olduğu görülmüştür. Pima 3-79 çeşidinin tohumunun TM-1 tohumundan daha ağır olduğu görülmüştür.

Alüminyum folyo içerisinde iyice ezilen örnekler 2 mL’lik steril tüplere alınmış ve izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2). Elde edilen DNA’ların içerik, miktar ve kalitesinin değişebileceği göz önünde bulundurularak tohum kabukları fiziksel yolla uzaklaştırılmış ve izolasyon tohum kabuğu olmadan gerçekleştirilmiştir. Tohum kabuğu anne genomunu taşımakta ve ayrıca kabuğun varlığı durumunda DNA kalite ve miktarı kabuksuz tohuma göre daha düşük olduğu bilinmektedir (Prof. Dr. Mehmet Karaca, Direkt Bilgi). Bu nedenlerden dolayı çalışmada kabuğu uzaklaştırılan tohumlardan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2. DNA ekstraksiyonu aşamaları **a)** Pamuk tohumunun alüminyum folyoya sarılması; **b)** Tohumun havaneliyle ezilmesi; **c)** Tohum kabuğunun uzaklaştırılması; **d)** Alüminyum folyoda iyice ezilmiş pamuk tohumu; **e)** Ezilen dokunun tüpe alınması; **f)** Doku üzerine solüsyon eklenmesi; **g)** Santrifüj edilme aşaması; **h)** Süpernatant DNA

Çalışmada sunulan DNA izolasyon yöntemi ve kiti kanserojenik ve mutajenik ajanlar içermeyen, çevreye ve araştırmacıya sağlık yönünden olumsuz bir etkiye sahip olmayan generatif ve vejatatif bitki kısımlarından ve bitki cins ve türlerinden etkin, diğer DNA izolasyon yöntemlerine göre daha ucuz ve aynı kalitede DNA üretme niteliğindedir. DNA izolasyonunda sıvı azot kullanımının olmaması kullanılan yöntemin diğer bir avantajlı yönüdür. Toplamda iki saatin altında DNA izolasyonuna izin vermesi, yüksek maliyetli altyapı ve deneyimli araştırmacıya ihtiyaç duymaması nedenlerinden dolayı çalışmada bu DNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

4.2. DNA Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi

Pamuk tohumlarından DNA izolasyon kiti kullanılarak elde edilen genomik DNA'ların miktarları ve kaliteleri, spektrofotometre ve agaroz jel elektroforez yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

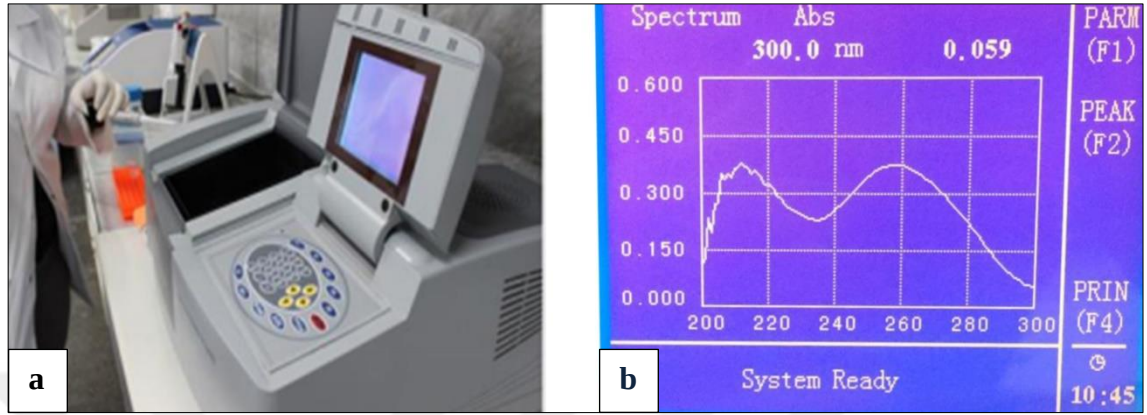
4.2.1. Spektrofotometrik yöntem ile DNA analizi

Yapılmış olan DNA izolasyonunun ardından DNA'nın miktar ve kalitesinin belirlenebilmesi için spektrofotometrik yöntemde 10 kat seyreltilmiş olan genomik DNA'lar 200 nm ile 300 nm arasındaki dalga boylarında spektrofotometre cihazı kullanılarak tarama yapılmıştır. Söz konusu aralıklarda nükleik asitler için ışın emiliminin en yüksek olduğu nokta 260 nm, proteinler için 280 nm ve polisakkarit ve diğer bazı moleküler için ise 230 nm'dir.

Çalışmada DNA'ların 200 nm ile 300 nm dalga boyları arasında absorbe ettiği UV ışın miktarına bakılmış, absorbans A_{230} , A_{260} ve A_{280} değerleri için spektrofotometrik okumalar yapılmıştır. Bu okumalardan alınan verilerde $A_{260/230}$ değeri, polisakkarit ve kimyasal kalıntısı varlığını ifade etmektedir. $A_{260/230}$ değeri polisakkarit, pigment veya bazı fenolik bileşiklerin kalıntıların olmadığını göstermesi açısından bu değerin en az iki veya daha fazla olması istenir.

$A_{260/280}$ değeri ise DNA kalitesi ve DNA'ya bağlı bulunan proteinler hakkında bize bilgi vermektedir. $A_{260/280}$ değerinin 1.7 ile 2 arasında olması istenilir. Yapılan okumalar ve elde olan bilgiler ışığında çalışma kapsamında elde edilen DNA örneklerinde, protein, polisakkarit, pigmentler, fenolik bileşikler ve RNA kalıntısı olmadığı görülmüştür. DNA miktarı ve konsantrasyonu, protein kalıntısı, polisakkarit varlığı, kimyasal kalıntı olup olmadığı, DNA'ya bağlı protein ve polisakkarit varlığı İnce (2010)'a göre değerlendirilmiştir.

Şekil 4.3'te çalışmada kullanılan çeşitlerden birine ait olan spektrofotometre taraması gösterilmektedir. Kaliteli bir DNA'da 300 nm dalga boyunda düşük absorbands görülürken 260 nm dalga boyunda yüksek bir absorbands değeri beklenmektedir (Karaca 2001; İnce 2010; Aydın 2013; Uygur-Göçer 2018).



Şekil 4.3. Spektrofotometre ile DNA kalitesinin belirlenmesi **a)** spektrofotometre cihazı; **b)** 200 nm – 300 nm arasındaki spektrofotometre okuması

Çizelge 4.1'de verilen spektrofotometre okumaları yorumlandığında; spektrofotometrik analizlerde elde edilen DNA'larda protein ve polisakkaritlerden arı, DNA kalitelerinin istenilen düzeyde olduğu ve miktarlarının çalışma için yeterli olacağı sonucuna varılmıştır. Fakat spektrofotometrik genomik DNA (gDNA) kalitesini ve miktarını gösterirken, izole edilen DNA'ya bağlı bulunan RNA kontaminasyonu ve izolasyon aşamasında oluşabilecek DNA kırılmalarını ortaya koyma konusunda bilgi sağlayamadığı için DNA'ların enzimlerle yapılan çalışmalarda kullanılıp kullanılmayacağı hakkında bilgi vermemektedir. Bu sebeple çalışmada kullanılan DNA'nın kalitesini belirlemek için diğer bir yöntem olan agaroz jel elektroforez yönteminde kullanılmıştır (İnce 2010).

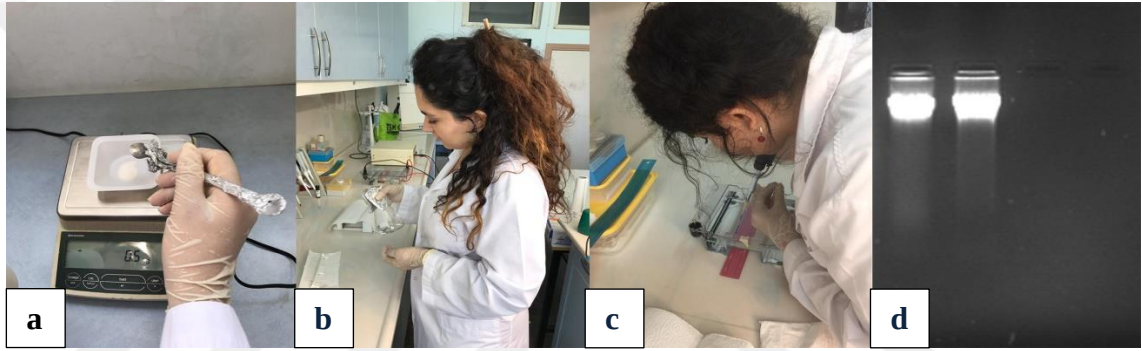
Çizelge 4.1. TM-1 ve Pima 3-79 çeşitlerine ait $A_{260/280}$ spektrofotometre okumaları

Tür	230 nm	260 nm	280 nm	260/230	260/280	$\mu\text{g/mL}$
TM-1	0.255	0.384	0.236	1.50	1.62	38.4
Pima 3-79	0.160	0.210	0.120	1.31	1.75	21

4.2.2. Agaroz jel elektroforez yöntemi ile yapılan analizler

Bu çalışmada yüksek moleküler ağırlıktaki DNA'nın varlığı elde edilen DNA'da polisakkarit olup olmadığı DNA'da RNA kalıntısının varlığını tespit edebilmek için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen genomik DNA'nın kalitesini belirlemek için %1'lik agaroz jel 1X TBE kullanılarak mikrodalga fırında hazırlanmış ve jel uygun sıcaklığa ulaştığında içerisinde 0.05 µg/mL etidiyum bromid kullanılarak hazırlanmıştır (Şekil 4.4).

Beşyüz nanogram olarak hazırlanan genomik DNA örnekleri yükleme çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra kuyucuklara her bir kuyucukta 10 µL olacak şekilde yükleme yapılmış, 60 dk süresince elektriksel alanda 5V/cm'de koşturulan DNA'lar UV DNA mor ötesi (ultra viole, UV) emilim ölçümleri aracılığıyla görüntülenmiş, UVpro programı yardımıyla elde edilen görüntüler bilgisayar ortamında fotoğraflanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Agaroz jel elektroforez aşamaları. Genomik DNA fotoğraflanması **a)** Agarozun hassas teraziyle tartılması; **b)** Jelin soğutulması; **c)** Genomik DNA yüklenmesi; **d)** Genomik DNA'nın fotoğraflanması

Yapılan görüntüleme işleminin ardından agaroz jel elektroforez işleminin sonucunda ekstraksiyonu yapılan örneklerin DNA'larında bir kırılma, RNA kontaminasyonu olmadığı aynı zamanda yüksek moleküler ağırlıkta oldukları ve DNA'ların enzimsel çalışmalarda kullanılabilecekleri sonucuna varılmıştır. İzole edilen DNA'ya bağlı bulunan polisakkarit ve proteinler enzimlerle yapılan çalışmaları ve PCR reaksiyonlarını olumsuz yönde etkiler. Bu sebeple yürütülen çalışmanın başarılı olması için kaliteli DNA'nın elde edilmesi gerekir (Aydın 2018). Yüksek moleküler ağırlık kavramı her ne kadar göreceli bir kavram olmakla birlikte 20 kb ve yukarısı DNA için kullanılan bir kavramdır. Ancak günümüzde 50 kb veya daha uzun tek sarmal DNA moleküllerinin yeni nesil yöntemlerle kullanılıyor olması yüksek moleküler ağırlık kavramının 100 kb ve ötesi için kullanılması gerekmektedir (Prof. Dr. Mehmet Karaca, Direkt Bilgi).

4.3. Lif Gen Spesifik Metilasyon Duyarlı Markırlar İçin Primer Çiftlerinin Belirlenmesi

Primer dizaynında erime sıcaklığı (T_m) PCR işlem basamaklarında yer alan yapışma veya bağlanma sıcaklığının belirlenmesi son derece önemlidir. PCR’de kullanılabilecek primer sayısı (yaygın olarak bir çift kullanılmakla) PCR’nin teksele veya multipleks oluşturulmasıyla doğrudan ilişkilidir. Yaygın olarak kullanılan PCR çalışmalarında primer çiftinin erime sıcaklığı T_m 50 °C ila 62 °C arasındadır. Bir primer çiftinin erime sıcaklık farkının fazla olmaması istenir. Ancak primer ve kalıp DNA’nın uzunluğunun, indirgemeli (touch-down) PCR kullanıp kullanılmamasına bağlı olarak bu farkın 5 °C’nin altında olması istenir. Yaygın olarak 0.5 °C fark uygundur. Ancak bir primer çiftinin ideal erime sıcaklığı farkı sıfırdır; çünkü PCR deneyleri yapılırken primerler aynı tüpe yerleştirilir ve bir çift primerden fazla primer çiftleri kullanılabilir (Chuang vd. 2013; Aydın 2018).

Çizelge 4.2 ve 4.3’de çalışma kapsamında dizayn edilmiş primer çiftleri ve bazı bilgiler sunulmuştur. Bilgiler genlerin aksesyon numaraları (AN ile gösterilmiştir), primer çiftlerinin adları (I olarak verilmiştir), primer çiftlerinin uzunluğu (pb olarak verilmiştir), primer çiftlerinin erime sıcaklıkları (T_m olarak verilmiştir), primer çiftlerinin %G/C (Yüzdece Guanin Sitozin İçeriği), her bir çifte ait İleri primer (“Forward”) yönü “F:”, geri primer yönü (“reverse”) “R:” ve PCR ürün boyutları (bp) olarak verilmiştir.

Bu çalışmada, *Gossypium hirsutum* genomu için dizayn edilen primer çiftlerinin erime sıcaklığı; ortalama 60.42, en yüksek erime sıcaklığı 61.92, en düşük erime sıcaklığı 58.46’dır. Aynı özellikler dikkate alınarak *Gossypium barbadense* genomundan dizayn edilen primerlerin T_m sıcaklığı; ortalama 60.31, en yüksek erime sıcaklığı 61.49 ve en düşük erime sıcaklığı 58.85’tir. Primer dizayn edilirken bir primer çifti arasındaki erime sıcaklığı farkının en fazla 1 °C olmasına özen gösterilmiştir. Böylelikle hem spesifisite artırılmış hemde çoğaltım başarısı katsayısı artırılmıştır.

Başarılı bir PCR’nin bir diğer bileşeni uygun G (Guanin) ve C (Sitozin) içeriğidir. İyi bir PCR primeri tasarlamak için primerde bulunan bazlarda %40-% 60 arasında olan G/C içeriğine sahip olan primerler tercih edilmekle birlikte neden bu oranların kabul gördüğüne dair iyi bir açıklama yoktur (Hyndman ve Mitsuhashi 2003). Ancak yüksek GC oranı demek yüksek annealing sıcaklığı uygulanabilirliği ile daha spesifik doğru bölgelere bağlanma demek olup aynı zamanda PCR başarısının ve doğruluğunun artırılması anlamına gelmektedir (Prof. Dr. Mehmet Karaca, Direkt Bilgi).

Bu çalışmada, *Gossypium hirsutum* genomu için dizayn edilen primerlerin G/C oranı ortalama %44.39 olup en yüksek %59.09, en düşük %40, *Gossypium barbadense* genomundan dizayn edilen primerlerin G/C oranı ise ortalama %44.91 olup en yüksek %54.55, en düşük %40 olan primerler ile genel kabul sınırları içerisinde yer alan primer çiftleri dizayn edilmiştir.

Başarılı bir PCR için spesiflik (sadece hedef loksun çoğaltılması) yüksek annealing sıcaklığı (uygun primer T_m değeri kullanılarak hesaplanır) ve süresi (annealing ve polimerizasyon süresi) ile kısmen de olsa primer çiftlerinin uzunluğuna

bağlıdır. Bu yüzden primer uzunluğu kritik bir öneme sahiptir (Wu vd. 1991). Genellikle 18-24 nükleotit uzunluğunda primer çiftleri, uygun GC ve uygun annealing sıcaklığı (genellikle 3-5 °C T_m nin altı) spesifiklik ve verimin korunması için en iyi şansı sağlamaktadır (Dieffenbach vd. 2011).

Bu çalışmada, *Gossypium hirsutum* genomu için dizayn edilen primerlerin uzunluğu en fazla 25 baz, en az 20 baz uzunluğunda olup ortalama 23 baz çifti uzunluğunda olan primerler dizayn edilmiştir. *Gossypium barbadense* genomundan dizayn edilen primerlerin ortalama uzunluğu 23 olup en uzun primer 24 bp en kısa primer 20 bp'ye sahiptir.

Bir primer çiftinin sol ve sağ hedef bölgeleri arasında kalan kısım ürün veya amplikon uzunluğu olarak bilinir ve bp ile ifade edilir. Genel olarak ürün uzunlukları 100 ila 1000 baz çifti (bp) uzunluğundadır. Çalışmada primerlerin belirlenmesinde kullanılan ürün boyutları belirlenirken birkaç faktör göz önünde bulundurulmuştur. Bu faktörlerin başında multipleks PCR çalışmalarında da kullanım olanaklarını artırmak için 100 ila 1000 bp göz önünde tutulmuştur. Ayrıca alt sınır tipik olarak bir agaroz jel üzerindeki amplikonu boyu 100 olarak ayarlanarak primer dimerlerle karıştırılma riski ortadan kaldırılmıştır. Primer dimerler birçok faktörün rol aldığı kimyasal süreçte primerlerin hedef genomik bölgeye bağlanmadan kendi aralarında bağlanmış çoğalma görüntüsü oluşturma durumudur (Prof. Dr. Mehmet Karaca, Direkt Bilgi). Üst sınır olarak 1000 bp'den büyük sekans boyutuna sahip olan dizileri amplifiye etmede zorlukların bulunması ve agaroz jel elektroforez yönteminin çözünürlüğünün düşük olması göz önüne alınarak 1000 bp belirlenen değerdir (Hyndman ve Mitsuhashi 2003).

Bu çalışmada *Gossypium hirsutum* genomu için dizayn edilen primerlerin amplikon boyutu ortalama 426 bp, en fazla 968 bp ve en az 100 bp uzunluğundadır. *Gossypium barbadense* genomundan dizayn edilen primerlerin ise ortalama ürün uzunluğu 403 bp en uzun ürün 940 en kısa ürün ise 159 bp büyüklüğündedir. Dizayn edilen primerler İnce (2010)'da belirlenen kriterlere uyum sağlamaktadır.

Çizelge 4.2 ve 4.3'de verilen primer çiftlerinin hem *Gossypium hirsutum* genomu hem de *Gossypium barbaense* genomlarında hedef bölgeleri çoğaltma yetenekleri bulunmaktadır. Böylelikle iki tür arasında hem genetik hem de epigenetik çalışmalarında kullanım olanakları bulunmaktadır. Bu durumun tespiti için çalışmamızda *in vitro* yöntemleri olarak adlandırılan bir seri denemeler gerçekleştirilmiş ve her iki türde çalışabildiği tespit ve teyit edilmiştir.

Çizelge 4.2. *Gossypium hirsutum* için dizayn edilen gen spesifik primer çiftleri

AN	PI	U	TM	%G/C	F/R	5'→3' Primer Dizisi	Boy (bp)
AF114254.1	AS001	21	60.16	52.38	F	GCTCTGTGGTGGTGTTTAGGA	240
		20	60.55	50.00	R	TCGGATGATGGTTGGATAACC	
AF487511.1	AS002	22	60.90	40.91	F	CTCATCACCATTTCCTCCATAAA	698
		21	60.62	42.86	R	CGAAAACGTAAGCATCATTCG	
AJ459185.1	AS003	24	60.36	41.67	F	GCTTCGGTGGATGAACTATTTAAG	100
		23	60.02	43.48	R	GTTGCCGAGAAGTGAATGTAATC	
EF140831.1	AS004	22	60.23	45.45	F	GCGGCATAAAATCTCTCAACTC	194
		23	60.11	43.48	R	AACTCATACGAACCTGTTGCAGT	
EF143832.1	AS005	21	61.06	42.86	F	GTGCTGTCATTCGTGGAAAAA	248
		20	60.21	50.00	R	GGCCCTGTTCTGCAAGATAA	
EF546797.1	AS006	22	61.83	50.00	F	GTATTTGTTCCGGACGTGTCAGC	689
		22	60.31	50.00	R	CCCACCAGTTCCTACTGTTTGT	
EU223831.1	AS007	21	61.50	47.62	F	TGTTGGTGTGGACAAAGCCTA	896
		24	61.47	41.67	R	ACCCATAAGAAAGTGTGATGTCG	
EU805592.1	AS008	22	60.72	40.91	F	TCCAATGCTTCTTTCGTTTCTC	400
		25	59.67	40.00	R	GCCTATAATTCCTCCTAATGGAAC	
EU826465.1	AS009	22	60.54	40.91	F	CCTCAATTTTGGATGGATTGTC	225
		24	60.19	41.67	R	ATTCCTAGCTTTGCTGTTAGGTTG	
FJ623274.1	AS010	23	60.85	43.48	F	CTGGTGGTTTTTCAGGCTATTCT	398
		24	60.03	41.67	R	GTTTATGTATGTCAGCATGGGGTA	
GQ340734.1	AS011	22	60.22	40.91	F	CTCCACTTTTCCATTTCATGT	298
		20	61.35	50.00	R	ATGTCCCTGTTTGGGGTTA	

Çizelge 4.2'nin devamı

AN	PI	U	TM	%G/C	F/R	5'→3' Primer Dizisi	Boy (bp)
GU359054.1	AS012	24	60.43	41.67	F	AGCTAGAGCGTCTTCATGTTTTTC	209
		22	61.36	50.00	R	CATGTCCCTCACCAACTCAACT	
HM142347.1	AS013	22	59.98	40.91	F	AGTCAATCACCCCTCAAAAGAA	367
		22	59.51	40.91	R	CACAATTTTATGGAAGCACTGG	
HM755453.1	AS014	21	60.05	47.67	F	GCAGTATTTGTTTCGGACGTGT	843
		22	60.54	40.91	R	GGTTTGGATTTTCAGATGATGG	
HQ143000.1	AS015	21	60.46	47.62	F	CGAGCTTGGGGACATAAGAAT	697
		23	60.52	43.48	R	AGGGCATATCCTTCATAGATTGG	
HQ143023.1	AS016	24	60.89	41.67	F	ATTGTGAACTCCTCAGAAAACCTG	641
		24	61.30	45.83	R	GGGATTGGAATTATAGTCGAGAGG	
HQ143035.1	AS017	24	59.16	41.67	F	CCAAAGTCTACTACGGGAAAGAAT	540
		24	60.70	41.67	R	CATATAAAACAACCCCAAGACC	
HQ143048.1	AS018	20	60.35	45.00	F	AATCATGCTCCGTGTTCCAT	279
		23	60.43	47.83	R	CTGTCACCCTGAACGATAGTGAT	
HQ891935.1	AS019	21	58.98	47.62	F	GAAGAAGAAGGTCTGGGCTTT	548
		24	59.83	41.67	R	CATTGCCTGTAAAACATCACCTAC	
JF722012.1	AS020	24	61.09	41.67	F	GGTAACGAACAAAATGTGAAGAGG	191
		20	60.70	40.00	R	CGCCCCATAAAACAAAAACA	
JF722037.1	AS021	21	60.46	47.62	F	CGAGCTTGGGGACATAAGAAT	697
		23	60.52	43.48	R	AGGGCATATCCTTCATAGATTGG	
JF722108.1	AS022	22	59.62	45.45	F	GGAGATAAACGCCACTGATTCT	929
		22	60.47	40.91	R	AAATTATACCTGCGCTGCAATC	

Çizelge 4.2'nin devamı

AN	PI	Boy u	TM	%G/C	F/R	5'→3' Primer Dizisi	Boy (bp)
JF722133.1	AS023	24	59.95	41.67	F	ACTAAGGTTGAAAGAGAGGCTGAA	940
		22	59.29	40.91	R	TGTTGCTAAAGAAGCTCAAGGA	
JF722228.1	AS024	22	61.07	40.91	F	AACAAAAGGGCTCACGGTTATT	234
		22	61.14	40.91	R	GATTGACCAACCAAACTGCAT	
JF722277.1	AS025	22	60.23	45.45	F	GCGGCATAAAATCTCTCAACTC	194
		23	60.11	43.48	R	AACTCATAACGAACCTGTTGCAGT	
JF722300.1	AS026	24	60.64	45.83	F	AACACTGGTATCTGGGATGAAGTC	500
		23	59.65	43.48	R	AGCTCTAGGAGGGATTGAAACAT	
JF722325.1	AS027	22	60.22	40.91	F	CTCCACTTTTCCATTTCCATGT	298
		20	61.35	50.00	R	ATGTCCCTGGTTTGGGGTTA	
JF722372.1	AS028	24	60.57	41.67	F	AAATGGACTGTTTAGTGCTCTCGT	393
		23	59.18	43.48	R	CTCCTCACCCCTGTTTTTCATAAG	
JF722444.1	AS029	24	59.83	45.83	F	GAGCCATACTGCTTTTACTCTTCC	202
		24	60.90	41.67	R	CATGTGTTTCATCATTCTGCTTAGG	
JF722061.1	AS030	22	60.35	45.45	F	TAGTGCTTTGGTGTTGCTTGAC	770
		24	59.48	41.67	R	AACCTGTGGAAGGAATCAGTAGTT	
HQ702186.1	AS031	24	59.83	45.83	F	GAGCCATACTGCTTTTACTCTTCC	195
		24	61.29	41.67	R	GCATCATTCTGCTTAGGATCAAAC	
JF330272.1	AS032	24	59.83	45.83	F	GAGCCATACTGCTTTTACTCTTCC	202
		24	60.90	41.67	R	CATGTGTTTCATCATTCTGCTTAGG	
JQ922562.1	AS033	22	58.46	40.91	F	CATCAAAGAGCAAATCAGTCCT	291
		24	59.66	41.67	R	CCTAACTCCCCTTTATATCCAACA	

Çizelge 4.2'nin devamı

AN	PI	Boy u	TM	%G/C	F/R	5'→3' Primer Dizisi	Boy (bp)
KF018239.1	AS034	24	60.04	41.67	F	TCCGTTGGATGCTCTACTTATACA	663
		24	60.06	41.67	R	GTTCTTTTCTCAGCTTTCCTGAAG	
KP197051.1	AS035	22	61.64	54.55	F	CTCTCTTCCAGTGTCGCTTCTG	242
		24	60.70	45.83	R	GATCCAACTCCATACCCAATACAC	
KM108000.1	AS036	22	60.33	59.09	F	CACTATACCCCTCCTCCTCTCC	425
		24	61.43	50.00	R	CTACAAACAGGACAGACCGAGTTC	
KT625611.1	AS037	23	59.76	47.83	F	GACCGATCCATGCTAGTCTCTAA	381
		22	60.05	40.91	R	GCAAAAATGCTCGAAAGCTAGT	
U30505.2	AS038	22	61.36	45.45	F	ACAAGAGCCAAGGTTTCATTCCT	474
		23	60.64	43.48	R	CCCATGTTGTTGTAACGATTCTC	
KY245910.1	AS039	22	60.22	40.91	F	CTCCACTTTTCCATTTCCATGT	298
		20	61.35	50.00	R	ATGTCCCTGGTTTGGGGTTA	
MF179011.1	AS040	22	60.91	40.91	F	AACCTTGCATCGTGAAGTTGAT	155
		24	60.47	41.67	R	GCAGAGAAAATTGGAGGAATACAG	
MH029701.1	AS041	20	61.92	50.00	F	AAATGGTTGACAGGGGGTTG	248
		23	59.70	47.83	R	AGTCTTTATGTCTGGGAGCACAC	
MH029714.1	AS042	21	61.78	57.14	F	ACCTGCAACGGCAGAGACTAC	968
		24	60.02	45.83	R	CTTATCCCTCACCCTACTCTTTCA	
MF974183.1	AS043	22	60.13	40.91	F	GTCAAAACAGGTTGTCCCAAAT	171
		24	60.09	41.67	R	AAACGAAGAGTTGAGGTTGTTAGG	
KY245909.1	AS044	22	59.99	40.91	F	GAATTTTCAGTTTGGTGGAAGC	186
		25	60.28	40.00	R	CAAGGTAACGAACCATATCTTCTTG	

AN: Aksesyon numarası, PI: Primer Adı, U: Uzunluk, TM: Erime Sıcaklığı, %G/C: Yüzde FGuanin Sitozin İçeriği, F: “Forward” İleri primer, R: “Reverse” Geri primer, bp: “base pair”, PCR ürün boyutu

Çizelge 4.3. *Gossypium barbaense* için dizayn edilen gen spesifik primer çiftleri

AN	PI	Boy	T/M	%G/C	F/R	5'→3' Primer Dizisi	Boy (bp)
U09805.1	AS045	22	60.60	45.45	F	CATGCAAGGCTCCTATTGAGAT	489
		21	60.23	47.62	R	GTGAATCCCATCTGTGTTTGG	
U34401.1	AS046	24	60.91	45.83	F	CTCATAACACTCGTCACCCCTTTCT	216
		24	60.57	41.67	R	ACTCTTCGTCATACTTTGGCTGTT	
GQ340735.1	AS047	24	59.82	41.67	F	ACTACACCTCCACTTTTCCATTTC	247
		21	60.46	47.62	R	CTTACCATCTCTTCCGCCAAT	
HQ142989.1	AS048	24	61.09	41.67	F	GGTAACGAACAAAATGTGAAGAGG	191
		20	60.70	40.00	R	CGCCCCATAAAACAAAAACA	
HQ143013.1	AS049	22	60.64	45.45	F	AGATAAACGCCACTGATTCTGC	250
		21	60.53	47.62	R	TTGACGATGAGGGTGATGAGT	
HQ143019.1	AS050	24	60.89	41.67	F	ATTGTGAACCTCCTCAGAAAACCTG	641
		24	61.30	45.83	R	GGGATTGGAATTATAGTCGAGAGG	
HQ143034.1	AS051	24	60.21	41.67	F	TGTTTCAGCCAGTGCTATAATGTCT	237
		23	60.97	43.48	R	CCTAACATCTTCCTCGCAAACT	
HQ143044.1	AS052	20	60.35	45.00	F	AATCATGCTCCGTGTTCCAT	279
		23	60.43	47.83	R	CTGTCACCCTGAACGATAGTGAT	
HQ143057.1	AS053	23	60.54	47.83	F	ATTACTTGAGAGGGAGTGGTGCT	207
		24	60.28	41.67	R	TGATCTTGTAAGGGATGTTGACAC	
HQ143068.1	AS054	22	59.86	54.55	F	GAGGACACACCATAGGGACTTC	231
		23	59.75	47.83	R	ACTCTAGTATTCCCCGACCATTC	
HQ143074.1	AS055	24	60.66	45.83	F	CCAAAAGGACTGTTTAGTGCTCTC	389
		22	59.24	40.91	R	CCCTGTTTTTCATAGGATGGTT	

Çizelge 4.3'ün devamı

AN	PI	U	T/M	%G/C	F/R	5'→3' Primer Dizisi	Boy (bp)
HQ143079.1	AS056	24	61.17	45.83	F	ACGGCACAGTAGTCATCCTTGTAT	159
		24	60.01	41.67	R	TCATTACCATCAACCCATACTCAC	
HQ143086.1	AS057	24	59.92	41.67	F	TTTGAGGAAAGCAGAGGAGTATCT	932
		24	60.67	41.67	R	CTACACAAGGGTGAAAAACCAAGT	
HQ143007.1	AS058	21	58.85	47.62	F	GGGTCTGAGGGATTATGTCAA	451
		21	59.89	47.67	R	CCATTTGCAGCTCTAGTTTGG	
HQ143026.1	AS059	23	60.38	43.48	F	GGAAGGAGATATTGGGGTATGAA	238
		22	59.64	45.45	R	CAAACATGGTCAACTCGAACTC	
HQ143062.1	AS060	24	60.64	45.83	F	AACACTGGTATCTGGGATGAAGTC	500
		23	59.65	43.48	R	AGCTCTAGGAGGGATTGAAACAT	
JN248438.1	AS061	22	61.26	50.00	F	GAGAAGCGGAGGTTGAAGAAGT	810
		22	60.68	50.00	R	CGTTGCTCCTGGTAAGCTACAT	
JF722032.1	AS062	21	61.49	47.62	F	CGAGCTTGGGCACATAAGAAT	697
		23	60.52	43.48	R	AGGGCATATCCTTCATAGATTGG	
JF722035.1	AS063	21	60.46	47.62	F	CGAGCTTGGGGACATAAGAAT	697
		23	60.52	43.48	R	AGGGCATATCCTTCATAGATTGG	
JF722081.1	AS064	23	60.99	52.17	F	GAAGCTGATAGAGAGGCTGGAAG	161
		21	60.46	47.62	R	AAACCCTAGCCGCATATTGAG	
JF722082.1	AS065	21	58.85	47.62	F	GGGTCTGAGGGATTATGTCAA	451
		21	59.89	47.62	R	CCATTTGCAGCTCTAGTTTGG	
JF722104.1	AS066	22	60.64	45.45	F	AGATAAACGCCACTGATTCTGC	250
		21	60.53	47.62	R	TTGACGATGAGGGTGATGAGT	

Çizelge 4.3'ün devamı

AN	PI	U	T/M	%G/C	F/R	5'→3' Primer Dizisi	Boy (bp)
JF722107.1	AS067	22	60.64	45.45	F	AGATAAACGCCACTGATTCTGC	250
		21	60.53	47.62	R	TTGACGATGAGGGTGATGAGT	
JF722129.1	AS068	24	59.95	41.67	F	ACTAAGGTTGAAAGAGAGGCTGAA	940
		22	59.29	40.91	R	TGTTGCTAAAGAAGCTCAAGGA	
JF722130.1	AS069	24	60.89	41.67	F	ATTGTGAACTCCTCAGAAAACCTG	641
		24	61.30	45.83	R	GGGATTGGAATTATAGTCGAGAGG	
JF722176.1	AS070	22	60.55	50.00	F	AACGATGGTCTCCTTCACACTC	837
		24	59.67	41.67	R	GGCTGTGTCTTGTGTACTTGTTC	
JF722179.1	AS071	24	60.21	41.67	F	TGTTTCAGCCAGTGCTATAATGTCT	237
		23	60.97	43.48	R	CCTAACATCTTCCTCGCAAACT	
JF722227.1	AS072	22	61.07	40.91	F	AAACAAAAGGGCTCACGGTTAT	249
		22	60.74	50.00	R	CCCTGAACGATAGTGATTGACC	
JF722273.1	AS073	22	60.23	45.45	F	GCGGCATAAAATCTCTCAACTC	194
		23	60.11	43.48	R	AACTCATACGAACCTGTTGCAGT	
JF722274.1	AS074	23	60.54	47.83	F	ATTACTTGAGAGGGAGTGGTGCT	207
		24	60.28	41.67	R	TGATCTTGTAAGGGATGTTGACAC	
JF722299.1	AS075	22	60.00	40.91	F	ATCCTGATGGTTCAAACCTTGCT	825
		24	59.77	45.83	R	CTGAGTGCTACAAATGACGGTACT	
JF722321.1	AS076	22	60.22	40.91	F	CTCCACTTTTCCATTTCATGT	298
		20	61.35	50.00	R	ATGTCCCTGGTTTGGGGTTA	
JF722322.1	AS077	24	60.13	45.83	F	TCTACTCCCACTTCTCATTTCTC	235
		21	60.09	47.62	R	ATCTCCAGCAGTCATCAATGG	

Çizelge 4.3'ün devamı

AN	PI	U	T/M	%G/C	F/R	5'→3' Primer Dizisi	Boy (bp)
JF722347.1	AS078	22	59.86	54.55	F	GAGGACACACCATAGGGACTTC	231
		23	59.75	47.83	R	ACTCTAGTATTCCCCGACCATTC	
JF722369.1	AS079	24	60.66	45.83	F	CCAAAAGGACTGTTTAGTGCTCTC	389
		22	59.24	40.91	R	CCCTGTTTTTCATAGGATGGTT	
JF722440.1	AS080	24	59.83	45.83	F	GAGCCATACTGCTTTTACTCTTCC	202
		24	60.90	41.67	R	CATGTGTTTCATCATTCTGCTTAGG	
JF722443.1	AS081	24	60.31	41.67	F	AGGACTTGATATTACCCCCAGAAT	231
		24	60.15	41.67	R	GACCTAAAAGGAACTCGCAGAATA	
JF722056.1	AS082	24	60.29	45.83	F	GGTACAACAGTCCTAAAAGCCATC	246
		23	60.17	43.48	R	ACCCGACATTAAGATGACAACAC	
JF722059.1	AS083	22	60.35	45.45	F	TAGTGCTTTGGTGTGCTTGAC	770
		24	59.48	41.67	R	AACCTGTGGAAGGAATCAGTAGTT	
JF330271.1	AS084	24	59.34	41.67	F	TTCTAAGGATAAAGAGGCAAGGAC	250
		24	60.15	41.67	R	GACCTAAAAGGAACTCGCAGAATA	
JN975924.1	AS085	20	60.07	50.00	F	CTCCCCCAGATTGCTGTAAA	175
		24	60.62	41.67	R	ATCTTGTAAGGGATGTGGACTTTG	
KF018241.1	AS086	24	60.04	41.67	F	TCCGTTGGATGCTCTACTTATACA	665
		24	60.06	41.67	R	GTTCTTTTCTCAGCTTTCCTGAAG	
KR997842.1	AS087	24	60.08	45.83	F	GGGTACGAGCAAAAGGAGATAGT	239
		24	60.27	41.67	R	CAGGATTGGCTTTAACAGGTTTAC	
JF722296.1	AS088	22	60.34	40.91	F	AAACTTGCTGGCTGTTCTTGTT	695
		24	60.07	45.83	R	CTGCTCCTCTCATTGTCACTCTAA	

AN: Aksesyon numarası, PI: Primer Adı, U: Uzunluk, TM: Erime Sıcaklığı, %G/C: Yüzde Guanin Sitozin İçeriği, F: “Forward” İleri primer, R: “Reverse” Geri primer, bp: “base pair”, PCR ürün boyutu

Çizelge 4.4’de primer çiftleri için hedef gen ve gen kısımları verilmiştir. Verilmiş olan gen ve gen bölgeleri incelendiğinde 54 genin epigenetik düzenlemelerde kullanılabilecek primer çiftleri olarak belirlendiği görülmektedir. *G. hirsutum* türünde *beta-tubulin* (TUB1), *lipit transferaz*, *ksiloglukan endo-trans-glikozilaz* (XTH), *ADP-glukoz fosforilaz* (ADPGp-2), *gibberellin 20-oksidad* (GA20ox3), *pektat liyaz* (Pel), *selüloz sentaz* (CesA4), *hidrolaz* (XTH1), *aktin* (ACT1), *protein kinaz* (CIPK1), *ekspansin* (Exp), *beta-mannosidaz*, *GTPase RacA*, *b-1,4-glukanaz*, *sükroz sentaz* (SusA1), *3-ketoacyl-coA sentaz 13* (KCS13), *fosfatidilinositol 4-kinaz 1* (PI4K1), *ubikitin E3 ligaz*, *3-ketoacyl-CoA sentaz* (KCS1) ve *sitokrom C oksidad* gibi hedef bölgelerin çalışılmasına olanak sağlayan primer dizinleri belirlenmiştir (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.4).

G. barbadense türünde ise *poligalaktronoz*, *pektat liyaz* (Pel), *14-3-3-proteini* (14-3-3L), *membran ilintili endo-1,4-beta-glukanaz* (CEL), *selüloz sentaz A1* (CelA1), *protein kinaz*, *ekspansin* (Exp), *lipid transfer protein 3* (LTP3), *peroksidaz* (POD2), *GTPaz* (RacA), *GTPaz* (RacB), *sükroz sentaz* (Sus1), *adenil siklaz* (CAP), *selüloz sentaz A3* (CelA3), *glikozil hidrolaz* (ManA2), *aktin 1*, *endo-1,4-beta-glukanaz*, *beta-mannosidaz* gibi hedef bölgelerin çalışılmasına olanak sağlayan primer dizinleri dizayn edilmiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4).

Çalışmada kullanılan pamuk türleri allotetraploid genoma sahip oldukları için her bir gen A alt genomunda 2, D alt genomunda 2 olmak üzere toplamda dört kopya halinde bulunmaktadır (Karaca 2001). Alloteraploid doğal yapısı nedeniyle pamukta gerek popülasyon genetiği gerekse de epiallellerin çalışılması diploid türler göre daha karmaşık ve daha zordur (Prof. Dr. Mehmet Karaca, Direkt Bilgi).

Çalışma kapsamında belirlen primer çiftleri hem A alt-genomu hem de D alt genomu düzeylerinde belirlenmiştir. Ancak bir genin A alt-genomu ve D alt-genomları arasında heterozigotluk durumu yaşandığında çalışma kapsamına geliştirilen primer çiftlerinin kullanılmasıyla geliştirilen GS-KUP markırlarının kullanımı sınırlı kalacaktır. Alternatif bir yol olan agaroz jel elektroforezde bant yoğunluğu dikkate alınarak bu durumun göreceli olarak azaltılabileceği ön görülmektedir (Prof. Dr. Mehmet Karaca, Direkt Bilgi).

Çizelge 4.4. *Gossypium hirsutum* için dizayn edilen primerlere ait özellikler ve restriksiyon enzimi kesim bölgesi sayısı

Primer I.	Çeşit	Gen Adı	Genom	REKB
AS001	GH	FS18A (FS18A)	-	1
AS002	GH	Beta-tubulin (TUB1)	-	2
AS003	GH	Kısmi myb155, Klon pGhMYB155	-	2
AS004	GH	Lipit transfer proteini 4 öncüsü (FSltp4), kcds:kloroplast	-	2
AS005	GH	Profilin (PRF), PRF-c allele	-	1
AS006	GH	Xyloglucan endotransglikozilaze (XTH), XTH-3 allele	-	2
AS007	Acala Maxxa	R2R3 MYB transcription factor	-	2
AS008	TM-1	ADP-glukoz fosforilaz küçük altbirim ADPGp-2	-	4
AS009	Acala Maxxa	R2R3 MYB transkripsiyon faktör	-	2
AS010	GH	Gibberellin 20-oksidad (GA20ox3)	-	3
AS011	GH	İzole 4 pektat liyaz (Pel)	-	3
AS012	GH	Klatrin ile ilişkili adaptör kompleksleri orta alt birim (APm)	-	1
AS013	LRA-5166	Selüloz sentaz (CesA4) Promotör bölgesi	-	4
AS014	GH	Xyloglucan endotransglukosilaz / hidrolaz (XTH1)	-	4
AS015	TM-1	Aktin (ACT1)	D	2
AS016	TM-1	Selüloz sentaz A1 (CelA1)	A	2
AS017	TM-1	CBL ile etkileşen protein kinaz (CIPK1)	A	2
AS018	TM-1	Ekspansin (Exp)	D	6
AS019	GH	GA2ox6	-	1
AS020	subsp. <i>Latifolium</i>	14-3-3-benzer protein	A	6
AS021	subsp. <i>Latifolium</i>	Aktin 1	D	2
AS022	subsp. <i>Latifolium</i>	Endo-1,4-beta-glukanaz	A	1

Çizelge 4.4'ün devamı

Primer I.	Çeşit	Gen Adı	Genom	REKB
AS023	subsp. <i>Latifolium</i>	Selüloz sentaz	D	6
AS024	subsp. <i>Latifolium</i>	Ekspansin	A	5
AS025	subsp. <i>Latifolium</i>	Lipid transfer protein	D	4
AS026	subsp. <i>Latifolium</i>	Beta-mannosidaz	A	7
AS027	subsp. <i>Latifolium</i>	Pektat liyaz	D	6
AS028	subsp. <i>Latifolium</i>	Küçük GTPase RacA	A	2
AS029	subsp. <i>Latifolium</i>	Sükroz sentaz (SusA1)	A	8
AS030	subsp. <i>Latifolium</i>	b-1,4-glukanaz-benzer	D	3
AS031	7235	Sükroz sentaz (SusA1)	-	3
AS032	acc. TM-1	SusA1	A	2
AS033	GH	3-ketoacyl-coA sentaz 13 (KCS13), Promotör bölgesi	-	1
AS034	GH	CFE protein	A	4
AS035	GH	Fosfatidilinositol 4-kinaz 1 (PI4K1)	-	2
AS036	TM-1	RING tipi ubiquitin E3 ligaz	-	2
AS037	GH	3-ketoacyl-CoA synthase 1 (KCS1)	-	2
AS038	GH klon	CKE6-1A E6	-	1
AS039	Bikaneri Narma	Pektat liyaz	-	3
AS040	TM-1	bHLH protein (PRE1,) Promotör bölgesi ve cds	-	1
AS041	GH	ImA protein	-	1
AS042	TM-1	Sitokrom c oksidaz alt birim 2 (cox2), cds; mitokondriyal		2
AS043	İ n2_NSM_Dt	MML4 (MML4)	-	2
AS044	Bikaneri Narma	CBS alan içeren protein (CBS)	-	2

İ:İzole,

Çizelge 4.5. *Gossypium barbadense* için dizayn edilen primerlere ait özellikler ve restriksiyon enzimi kesim bölgesi sayısı

Primer I.	Çeşit	Gen Adı	Genom	REKB
AS045	GB	Poligalaktronoza	-	1
AS046	GB	FbLate-2	-	1
AS047	GB	İzole 5 pektat liyaz (Pel)	-	8
AS048	Hai7124	14-3-3-protein benzeri (14-3-3L)	A	5
AS049	Hai7124	Zara bağlı endo-1,4-beta-glukanaz (CEL)	A	6
AS050	Hai7124	Selüloz sentaz A1 (CelA1)	A	4
AS051	Hai7124	CBL ile etkileşen protein kinaz	D	2
AS052	Hai7124	Ekspansin (Exp)	D	6
AS053	Hai7124	Lipid transfer protein 3 (LTP3)	A	2
AS054	Hai7124	Bakteriyal -indüklenmiş peroksidaz (POD2)	A	7
AS055	Hai7124	Küçük GTPase (RacA)	D	1
AS056	Hai7124	Küçük GTPase (RacB)	A	3
AS057	Hai7124	Sükroz sentaz (Sus1)	D	2
AS058	Hai7124	Adenil siklaz ilişkili protein (CAP) geni	A	7
AS059	Hai7124	Selüloz sentaz A3 (CelA3)	D	2
AS060	Hai7124	Glikozil hidrolaz (ManA2)	D	7
AS061	GB	Sükroz sentaz izoform C (susC)	-	6
AS062	var. <i>Brasiliense</i>	Aktin 1	A	5
AS063	var. <i>Peruvianum</i>	Aktin 1	D	5
AS064	var. <i>Brasiliense</i>	Adenil siklaz ilişkili protein	D	3
AS065	var. <i>Peruvianum</i>	Adenil siklaz ilişkili protein	A	8
AS066	var. <i>Brasiliense</i>	Endo-1,4-beta-glukanaz	A	5

Çizelge 4.5'in devamı

Primer I	Çeşit	Gen Adı	Genom	REKB
AS067	<i>var. Peruvianum</i>	Endo-1,4-beta-glukanaz	D	6
AS068	<i>var. Brasiliense</i>	Selüloz sentaz	D	6
AS069	<i>var. Peruvianum</i>	Selüloz sentaz	A	6
AS070	<i>var. Brasiliense</i>	Kalsinörin B benzeri protein etkileşimli protein kinaz	A	2
AS071	<i>var. Peruvianum</i>	Kalsinörin B benzeri protein etkileşimli protein kinaz	D	2
AS072	<i>var. Peruvianum</i>	Ekspansin	D	6
AS073	<i>var. Brasiliense</i>	Lipid transfer protein	D	3
AS074	<i>var. Peruvianum</i>	Lipid transfer protein	A	2
AS075	<i>var. Peruvianum</i>	Beta-mannosidaz	D	8
AS076	<i>var. Brasiliense</i>	Pektat liyaz	D	7
AS077	<i>var. Peruvianum</i>	Pektat liyaz	A	3
AS078	<i>var. Peruvianum</i>	Bakteri kaynaklı peroksidaz	D	2
AS079	<i>var. Brasiliense</i>	Küçük GTPase RacA	D	1
AS080	<i>var. Brasiliense</i>	Sükroz sentaz SusA1	A	3
AS081	<i>var. Peruvianum</i>	Sükroz sentaz SusA1	D	1
AS082	<i>var. Brasiliense</i>	b-1,4-glukanaz	A	2
AS083	<i>var. Peruvianum</i>	b-1,4-glukanaz	D	5
AS084	Hai7124	SusA1	D	2
AS085	GB	Lipit transfer proteini öncü (LTP7)	-	4
AS086	GB	CFE protein	A	4

Çizelge 4.5'in devamı

Primer I.	Çeşit	Gen Adı	Genom	REKB
AS087	Hai7124	Pamuk lifi ifade eden protein (CFE5D)	-	4
AS088	var. <i>Brasiliense</i>	Beta-mannosidaz	A	2

Primer I.: Primer ID veya Adı

4.4. Restriksiyon Enzim Uygulamaları

Çalışma kapsamında *MspI* ve *HpaII* izoşizomerleri kullanılmıştır. İzoşizomerler normalleştirilmiş olan genomik DNA örneklerinde paralel olarak ayrı ayrı muamele edilerek hedef bölgelerde sınırlı kesim (endonükleaz) aktiviteleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada gösterilmemekle birlikte birimimizde *MspI* ve *HpaII* izoşizomerlerin kullanılan pamuk türlerinin genomik DNA örneklerini etkili bir şekilde kestigi belirlenmiştir (Karaca vd. 2019).

4.5. Hedef Lokusların Amlifikasyonu ve GS-KUP Markırları

Gelişimde önemli bir rol oynayan DNA metilasyonu aynı zamanda genom stabilitesine katkıda bulunur ve adaptasyon ve evrimi destekleyen dış faktörlere yanıt oluşturabilir. Organizmayı uyaran farklı dış faktörleri türlerini belirli biyolojik süreçlerle ilişkisini açıklamak için genomda değişen 5-metilsitozin dağılımına sahip genom bölgelerinin tanımlanması önemlidir (Fulnecek ve Kovarik 2014; Uygur-Göçer 2019; Karaca vd. 2019).

DNA metilasyon çalışmalarında metilasyona duyarlı, metilasyon duyarsız ve metilasyon bağımlı spesifik endonükleazlar yaygın olarak kullanılır DNA metilasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan iki endonükleaz, *MspI* ve *HpaII* izoşizomerleri metillenmiş ve metillenmemiş hedeflerin kesimleri açısından iyi tanımlanmıştır (Karaca vd. 2019).

Metilasyona duyarlı, metilasyona duyarsız ve metilasyon spesifik endonükleazlar, DNA metilasyon çalışmalarında en çok kullanılan enzimler arasındadır. *MspI* ve *HpaII* izoşizomerleri metilasyon çalışmalarında en yaygın kullanılan endonükleazlardır. Bu izoşizomerlerin spesifitesi, metillenmiş ve metillenmemiş hedeflerin kesimleri açısından iyi tanımlanmıştır (Çizelge 4.6). Ancak yeni tasarlanan restriksiyon enzimleri de mevcut olup *MspI* ve *HpaII* izoşizomerleri yerine kullanımı söz konusudur (Prof. Dr. Mehmet Karaca, Direkt Bilgi).

Çizelge 4.6. Epiallelik farklılıkların belirlenmesinde oluşan paternler*

										<i>MspI</i>		<i>Hpa</i> II	
1. Durum	C		C		G		G		+	+	CCGG		
	G		G		C		C						
2. Durum	C		^m C		G		G		+	-	CmCGG		
	G		G		^m C		C						
3. Durum	^m C	^m C	G	G	^m C	C	G	G	-	+	CCmGG		
	G	G	C	C	G	G	C	C					
4. Durum	^m C		^m C		G		G		-	-	CmCmGG		
	G		G		^m C		^m C						

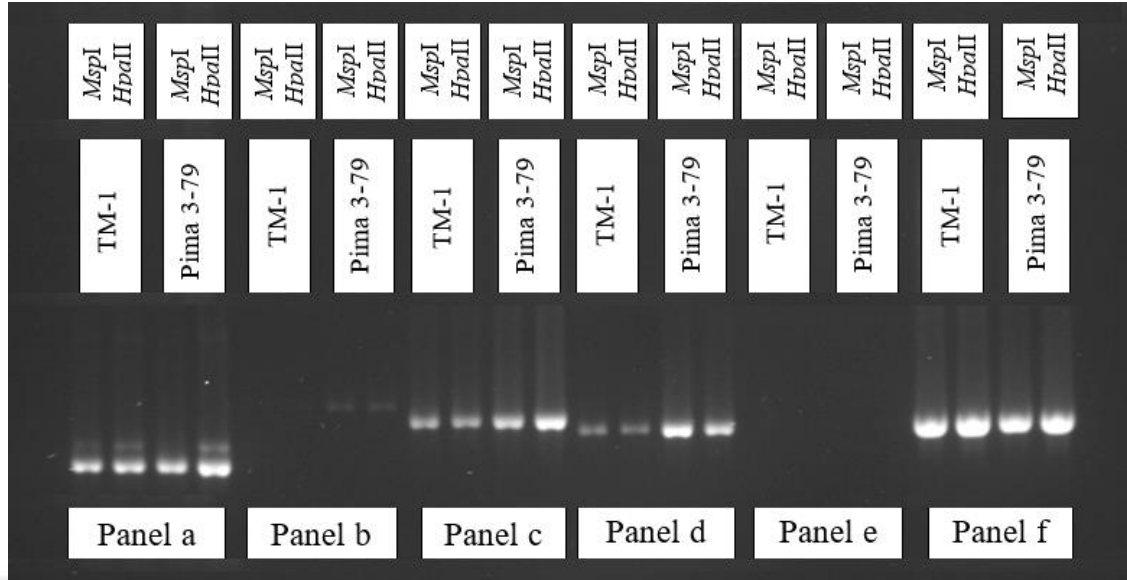
*: + enzimin hedefi tanıyıp kesmesini gösterirken – enzimin kesmemesini göstermektedir

Bu çalışmada PCR işleminden sonra örnekler *MspI* ve *HpaII* enzimleriyle yapılan uygulama sonucu oluşan farklılıkları tespit edebilmek amacıyla %3'lük agaroz jel elektroforezinde 70 Volt elektrik akımı ile 1.5 saat yürütülmüş ve oluşan bant farklılıkları Çizelge 4.6'da verilen kurallara göre belirlenmiştir.

Analizlerde 4 farklı patern durumu söz konusudur. *MspI* ve *HpaII* reaksiyonlarının her ikisinin hedef bölgesinin kesilmesi durumu (+,+ veya 0,0) olup hedef CCGG metil içermediği şeklinde yorumlanmıştır. Her iki reaksiyonda (*MspI* ve *HpaII*) orijinal fragmanların bulunması durumu reaksiyonun tam metillenme nedeniyle (mCmCGG) gerçekleşemediği durumunu ifade etmiş ve (-,- veya 1,1) olarak gösterilmiştir. *MspI* ve *HpaII* reaksiyonlarında karşılaştırıldığında *MspI* de bandın bulunması *HpaII* ise bulunmaması (+,- veya 1,0) durumu CmCGG olarak (CG metilasyonu) tanımlanmıştır. Dördüncü durum ise metilasyonun CHG ve CGmotifinin her ikisinde olma durumunda karşımıza çıkabilen ve (-, + veya 0,1) olarak kodlanabilecek durumdur. İstatistiksel analizleri ise (Wang vd. 2011)'e göre Mann-Witney testleri uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Karaca 2017).

Çalışmada geliştirilen primer çiftlerinde kullanılan bütün kriterler ve yaklaşımlara aynı metodoloji kullanılarak geliştirilmiş ve birimde bulunan primer çiftleri kullanarak yaklaşımla elde edilen 6 primer çifti kullanılabilirlikleri teyit edilmiştir. Şekil 4.5'te amplikon profilleri gösterilmektedir.

Şekil 4.5'te verildiği sırayla primer çifti a-f amplifikasyon sonucu gösterilmektedir. Şekilde Panel a primer a çifti ile çoğaltılmış TM-1, TM-1, Pima 3-79, Pima 3-79 genomik DNA sıralaması mevcuttur. Türler için ait genomik DNA örnekleri *MspI* ve *HpaII* restriksiyon enzimleri ile muamele edilen örneklerdir. TM-1 *G. hirsutum*u temsil ederek Pima 3-79 *G. barbadense*'yi temsil etmektedir.



Şekil 4.5. *Msp I* ve *Hpa II* enzimleriyle kesimi yapılan TM-1 ve Pima 3-79 DNA'ların PCR amplifikasyon sonucu

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi;

Panel a'da Pima 3-79 örneğinin ilgili lokusunda metilsizlik söz konusu iken aynı lokusun TM-1 örneğinde metilli olduğu görülmektedir. Bu durumda ilgili lokustaki genin epiallelik özellik gösterdiği anlaşılmaktadır.

Panel a'da Pima 3-79 örneğinin ilgili lokusunda metilli olduğu söz konusu iken aynı lokusun TM-1 örneğinde metilsiz olduğu görülmektedir. Panel a lokusundaki durumun tam tersi bir durum Panel b'de görülmüştür. Bu durumda ilgili lokustaki genin epiallelik özellik gösterdiği anlaşılmaktadır.

Panel c ve Panel f'de görüldüğü üzere hem Pima 3-79 hem de TM-1 örneklerindeki aynı lokus her iki türde de metilli olup epiallelik özellik göstermemektedir.

Panel d'de ortaya çıkan durum Pima 3-79 örneğinde A ve D alt-genomları arasında epiallelik farkın olmadığı diğer tarfardan TM-1 örneğinin yine A ve D alt-genomları arasında epiallelik fark olmamasına rağmen her iki tür arasında CCGG dizisindeki kısmi metilasyon farklılığının olduğunu göstermektedir.

Panel e'de gösterilen durum ise her iki türün ilgili lokus yönünden metilsiz olduğu ve epiallelik özellik göstermediği gösterilmektedir. Bilgiler birlikte değerlendirildiğinde çalışma kapsamında geliştirilen AS primer çiftlerinin hem *G. hirsutum* türlerine ait çeşitlerde hem *G. barbadense*'ye ait türlere ait çeşitlerde hem de bu türler arasında melezlemeler ile oluşturulan hat ve çeşitlerin epigenetik çalışmalarında kullanılabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Bitkilerde en yaygın DNA metilasyonu sitozin bazında gerçekleşmekte ve metil sitozin beşinci baz olarak adlandırılmaktadır. Pamuk bitkisinde gen elementleri düzeyinde epigenetiksel çalışma sayısı çok fazla değildir. Epiallelerin tespitinde kullanılabilir gen ve gen elementlerinin tespitinde kullanılabilir markırların geliştirilmesi son derece yararlıdır. Pamuk bitkisi her ne kadar önemli bir yağ bitkisi olsa da birinci yetiştirilme amacı lifleri içindir. Bu bağlamda lif gelişimiyle ilgili epiallelerin tespitinde kullanılabilir yeni yöntem ve markırları lif kalite ve miktarının artırılmasında önemlilik göstermektedir.

Çalışmada kullanılacak iki pamuk çeşidinden biri üretici tipi olup üreticilerin tercih ettiği (TM-1), diğeri ise tekstil tipi olup tekstil sektöründe tercih edilen (Pima 3-79) pamukların seçilmiş olması nedeniyle hem lif miktarı hem de kalitesiyle ilgili epiallelerin tespitine katkı sunmaktadır. Bunlara ek olarak GS-KUP markırlarının gen elementi bazında olması diğeri bir önemli durumdur. Sonuç olarak çalışmada elde edilecek epiallelik markırların kullanımıyla epigenetik düzenlemeler hakkında bilgiler üretilebilecektir.

5. SONUÇLAR

Endüstri bitkileri içerisinde yer alan pamuk (*Gossypium* L.), sanayinin birçok dalının ana ham maddesi olması nedeniyle gerek dünya gerekse de ülkemiz açısından son derece önemli bir kültür bitkisidir. Hızla artan dünya nüfusu ve insanların değişen ve gelişen hayat standartları pamuğa duyulan ihtiyacı her geçen gün daha da arttırmaktadır. Bu çalışmada pamuk epigenetik çalışmalarında kullanılmak üzere AS olarak adlandırılan primer çiftleri belirlenmiştir. Geliştirilmiş olan primer çiftleri üretim sektöründe tercih edilen bir pamuk (Upland) olan *G. hirsutum* genomuna ait Texas Marker-1 (TM-1) ve tekstil sektöründe tercih edilen (Pima veya Mısır Pamuğu) bir pamuk tipi olan *G. barbadense* genomuna ait Pima 3-79 (3-79) örneklerinde kullanılarak yararlılıkları tespit edilmiştir.

DNA metilasyonunun belirlenmesinde birbirlerinden farklı çok sayıda yöntem ve yaklaşım vardır. Bu çalışmada epiallellerin tespitinde kullanılabilecek ekonomik ve alt yapı gerektirmeyen “Methylation Sensitive Amplification Polymorphism” (MSAP) yöntemine benzerlik gösteren ve birimimizde geliştirilen Gen Spesifik Kısmi Uzunluk Polimorfizm (GS-KUP) yönteminde kullanılacak lokus ve primer çiftlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Primer çiftlerinin belirlenmesi için genlere ait diziler ve ilgili bilgiler GenBank veri tabanından Fasta formatında Batch Entrez yazılım programı kullanılarak toplu bir şekilde indirilmiştir.

İlgili gen dizileri birimimizde geliştirilmiş olan EpiOne ve birimimizde bulunan Sequencher 4.9 yazılım programı kullanılarak CCGG diizleri içeren genler ayrı dosyalar olarak kayıt altına alınmıştır. İlgili dosyalar yine Sequencher 4.9 yazılım programı kullanılarak primer tasarımı yapılması mümkün olan dosyalar yine Fasta formatında kayıt altına alınmıştır. AS primer çiftlerinin dizaynı için Primer 3 Input (Version 0.4.0) programı kullanılmıştır.

Geliştirilen primer çiftlerinin ürünleri üzerinde (hedef lokus dizileri üzerinde, ancak primer dizileri üzerinde olmayan) *MspI* ve *HpaII* izoşizomerlere ait palindromik tanıma bölgeleri bulunmaktadır. Böylelikle CCGG polindromik diziler üzerinde birinci ve ikinci sitozin bazında bulunan metil durumuna göre farklılık tespit edilebilmektedir. Çalışmada 88 adet primer çifti geliştirilmiş olup toplamda 54 lokus üzerinde çalışma fırsatı sunabilmektedir. Çalışmada belirlenen 88 primer çiftinden yarısı *G. hirsutum* türüne ait iken diğer yarısı *G. barbadense* türüne aittir.

In silico aşamalardan sonra laboratuvar koşullarında TM-1 ve Pima 3-79 genomlarına ait tohumlardan elde edilen genomik DNA amplifikasyonunun oluşup oluşmayacağını belirlemek amacıyla ön deneme yapılmıştır. Yapılan ön denemede ilk olarak bu türlere ait DNA izolasyonu Karaca ve İnce tarafından Akdeniz Üniversitesi’nde geliştirilip patenti alınmış olan Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılmış ve Kit protokolü uygulanmıştır. Elde edilen genomik DNA örneklerinin kalitesi ve miktarı belirlendikten sonra normalleştirme işlemi yapılan örnekler restriksiyon enzimleriyle kesime tabii tutulmuştur, PCR işlemi ile amplifikasyonu yapıldıktan sonra agaroz jel elektroforez işleminin ardından jel görüntüsü çekilmiş ve epialleller tespit edilebilmiştir. Bu durum çalışmanın ana hedefi olan pamuk bitkisinde GS-KUP yönteminin geliştirilebildiğini göstermiştir.

Çalışmada teyit amaçlı olarak seçilerek altı lokusta yapılan ön denemelerde belirlenen primer çiftlerinin ümit vadettiği ve amplifikasyon yapabilecekleri yapılan ortaya koyulmuş ve bunun sonucunda lif özellikleriyle ilgili epiallellerin tespitinde kullanılabilecek oldukları görülmüştür. Geliştirilen primer çiftlerinin markırların geliştirilmesinde kullanılabilecek özelliklere sahip oldukları görülmüştür.

Dünyada %98'lik bir üretim payıyla tekstil ve üretici sektörünün tercih ettiği iki tip pamuk türü arasında lif özelliklerine etki eden genlerdeki metilasyon düzeyleri arasındaki farklılıkların belirlenebilecek olmasıyla beraber lif özellikleriyle ilgili genlerin ve gen elementlerinin epigenetiksel düzenlemelerinin belirlenmesinin sağlanacaktır. Pamukta lif özelliklerinin oluşumunda epigenetiksel katkılar incelenebilecektir.

Epiallellerin tespiti için kullanılabilecek bisülfıt sekanslama (BS), sonraki nesil sekanslama (NGS) ve genotipleme (GBS, WGR) yöntemlerinin maliyet, yüksek örnek sayısı, yüksek ploidy ve kompleks genomlardan kaynaklanan sebeplerle bu yöntemlerin uygun olmadığı durumlarda epiallellerin tespitinde kullanılabilecek ekonomik ve alt yapı gerektirmeyen Gen Spesifik Kesilmiş Uzunluk Polimorfizm (GS-KUP) markırlarının geliştirilmesi için sonraki çalışmalara kaynak oluşturabilecektir.

Dizaynı yapılan primerler denendiğinde aralarında epiallelik farklılık gösterenler epiallel markırları olarak tespit edilebilecek ve buna bağlı olarak epigenetik düzenlemeler hakkında bilgiler ortaya konabilecektir. Çalışmada ortaya koyulan primerler *In silico* çalışmalarda kaynak olarak kullanılabilecektir.

Lifi ile tekstil ve diğer sanayi kollarında (örme sanayi, dokuma sanayi), tohumu ile; tohumluk, küspe (hayvan yemi), linteri ile; yatak ve dolgu malzemesi, selüloz ve kimya endüstrisinde kağıt üretimi, kozmetik, para kağıdı üretimi, savaş endüstrisinde barut yapımı, ham yağı ile; sabun yapımı, rafine yağ üretimi (margarin, rafine likit yağ üretimi) biyodizel üretimi gibi pek çok alanda ham madde olarak kullanılan pamukta epiallellerin tespit edilmesiyle pamukta lif oluşumunda meydana gelen epigenetiksel düzenlemeler ortaya koyulabilecektir. Tekstil ve üretici sektörünün tercih ettiği pamukların seçilmesi nedeniyle hem lif özellikleri hem de kalitesiyle ilgili epiallellerin tespiti yapılabilecek iki pamuk çeşidi arasındaki farklılıkların belirlenmesine katkı sunulabilecektir. Birinci derecede lif, ikinci derecede yağ bitkisi olan pamuğun lif özelliklerine özgü epiallellerin belirlenmesi lif kalite ve miktarının artırılmasında önemlidir.

6. KAYNAKLAR

- Abd-Elsalam, K. A. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*, 2 (5): 91-95.
- Agorio, A. et al. 2017. An *Arabidopsis* natural epiallele maintained by a feed-forward silencing loop between histone and DNA. *Plos Genetics*, 13 (1):1-23.
- Anonim 1: <https://ticaret.gov.tr> [Son erişim tarihi: 16.01.2020].
- Anonim 2: <http://www.tuik.gov.tr> [Son erişim tarihi: 18.03.2017].
- Anonim 3: <https://www.asianscientist.com> [Son erişim tarihi: 20.01.2020].
- Aras, S., Aydın, S.S., Fazlıoğlu, A., Duman, D.C., Büyük, İ. ve Derici K. 2015. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72 (3): 255-262.
- Aydın, A. 2013. Pamuk (*Gossypium* L.) Kromozom substitüsyon hatlarının mikrosatellit markırları kullanılarak belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 118 s.
- Aydın, A. 2018. Türkiye’de tescillenmiş bazı ticari pamuk çeşitlerinin moleküler karakterizasyonu üzerine bir araştırma. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 342 s.
- Aydın, A., Karaca, M. ve İnce, A. G. 2019. Comparison of isoschizomers for epigenetic research in cotton. 8-10 April, International Congress on Agriculture and Forestry Research, ss. 514-521. Marmaris, Turkey.
- Balçık, B. 2019. Ulusal pamuk konseyi pamuk sektör raporu 2018. (yayınlanmamış), Söke-Aydın.
- Bartels, A. et al. 2018. Dynamic DNA methylation in plant growth and development, *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (2144): 1-17.
- Bharadwaj, R., Roy, M., Ohyama, T., Sivan-Loukianova, E., Delannoy M., Lloyd T.E., Zlatic, M., Eberl D. F. and Kolodkin A., 2013. Cbl-associated protein regulates assembly and function of two tension-sensing structures in *Drosophila*. *Development*, 140(3): 627-638.
- Bird, A. 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447: 396-398.
- Birren, B. and Eric, L., 1993. Pulsed field gel electrophoresis: A Practical Guide, Academic Press Inc. San Diego, California, pp. 1-6.
- Bonosio, R., 2015. The expanding epigenetic landscape of non-model organisms, *The Journal of Experimental Biology*, 218 (1): 114-122.
- Can, M. İ. ve Aslan, A. Epigenetik mekanizmalar ve bazı güncel çalışmalar. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6 (2): 445-452.
- Chee, W. P., Draye, X., Jiang, X.C., Decanini, L., Terrie, A., Bredhanerr, R., Smith C.W. and Paterson, A. H., 2005. Molecular dissection of phenotypic variation between *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* (Cotton) by backcross-self aprooach: III. Fiber legenth. *Theor. Appl. Genet*, 111: 772-781.
- Chuang L. Y., Cheng Y. H. and Yang C. H., 2013. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett*, 35 (10):1541–1549.

- Çetin, F. ve Karadeniz, E. 2013. Pamuk Raporu. No: 2148-1962. (GAP UTAEM Güncel).
- Dieffenbach, C. W., Lowe T. M. J., and Dveksler G. S. 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Res.*, 3: 30-37.
- Diez, M. C., Roessier, K. and Gaut, B.S. 2014 Epigenetics and plant genome evolution. *Current Opinion in Plant Biology* 18: 1-8.
- Flagel L. E., Wendel J. F. and Udall J. A. 2012. Duplicate gene evolution, homoeologous recombination, and transcriptome characterization in allopolyploid cotton. *BMC Genomics*, 13: 302.
- Fryxell, P. A. 1968 A redefinition of tribe *Gossypieae*. *Bot. Gazette* 129 (4): 296–308.
- Fryxell, P. A. 1978. The natural history of the cotton tribe. Texas A&M Univ. Press, College Station TX., pp. 18-245.
- Fulneček, J. and Kovařík, A. 2014. How to interpret methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) profiles? *BMC Genetics*, 15 (2): 1-9.
- Furrow, R. E., Christiansen F. B., Feldman M. W. 2011. Environment-sensitive epigenetics and the heritability of complex diseases. *Genetics*, 189 (49): 1377-1387.
- Goettel, W. and Messing, J. 2013. Epiallele biogenesis in maize. *Gene*, 516: 8-23.
- Guangyuan, L., Xiaoming, W., Biyun, C., Gao, G. and Kun, X. 2007. Evaluation of Genetic and epigenetic modification in rapeseed (*Brassica napus*) Induced by Salt Stress, *Journal of Integrative Plant Biology*, 49 (11): 1599-1607.
- Hamawand, I., Sandell, G., Pittaway, P., Chakrabarty, S., Yusaf, T., Chen, G., Seneweera, S., Al- Lwayzy, S., Bennett J. and Hopf, J. 2016. bioenergy from cotton industry wastes: A review and potential. *Elsevier*, 66: 435-448.
- Hendrix, B. and Stewart, J. M. 2005. Estimation of the nuclear DNA content of *Gossypium* species. *Ann. Bot.*, 95 (5): 789–797.
- Holliday, R. 1987. The inheritance of epigenetic defects. *Science*. 238 (4824): 163-170.
- Holliday, R. 1993. Epigenetic Inheritance Based on DNA Methylation. *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. Springer, Cham, pp. 452-468
- Holliday, R., 1994. Epigenetics: An overview. *Dev. Genet.*, 15 (126): 453–457.
- Hu, Y. et al. 2019. *Gossypium barbadense* and *Gossypium hirsutum* genomes provide insights into the origin and evolution of allotetraploid cotton. *Nature Genetics*, 51: 739-748.
- Hyndman, D. L. and Mitsunashi, M. 2003. PCR primer design. *Methods in Molecular Biology*, 226: 81-88.
- Ince A. G. ve Karaca, M. 2019. Epigenetik mekanizmalar ve tarımsal üretimde epigenetik yaklaşımlar. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 12 (2): 51-58.

- Ince, A. G. ve Karaca M. 2017. Development and utilization of bisulfite specific primer pairs for epigenetic studies in *Solanum lycopersicum* L. *Journal of Scientific and Engineering Research*, 4 (11): 145-153.
- İnce, A. G. 2010. Doku/organ spesifik mikrosatellit dna gen içeriklerinin capsicum cdna kütüphanelerinde *In Silico* ve *In Vitro* yaklaşımlarla belirlenmesi. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi. 300 s.
- Jaerish, R. and Bird, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nature Genetics Supplement* 33; 245-254.
- Kalisz, S. and Purugganan, M. D. 2004. Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 19 (6):309-314.
- Karaca, M. and Ince A. G. 2016. EpiOne: A Software tool for identification of potential cytosine DNA methylation marks in promoters and gene bodies. *Journal of Scientific and Engineering Research*, 3 (4): 295-301.
- Karaca, M. and Ince, A. G. 2011. New non-redundant microsatellite and CAPS-microsatellite markers for cotton (*Gossypium* L.). *Turkish Journal of Field Crops* 16 (2): 172-178.
- Karaca, M. and Ince, A. G. 2018. Conservation of Biodiversity and Genetic Resources. In: Farooq M, Pisante M (Ed.) *Innovations in Sustainable Agriculture*. Springer, Cham, pp.363-410.
- Karaca, M. and Ince, A. G., 2017. Molecular Markers in *Salvia* L.: Past, Present and Future. In: Georgiev, V. and Pavlov, A. (Ed.), *Salvia Biotechnology*. Springer, Cham, pp. 291-398.
- Karaca, M. ve İnce A. G. 2015. Moleküler Biyoloji Ders Notu. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi basımevi yayınları: 23, Ders Kitabı, Antalya, 221s.
- Karaca, M., 2001. Characterization of *Cynodon* spp. and *Gossypium* spp. genomes using molecular and cytological techniques. Doktora Tezi, Mississippi State University, Mississippi State.
- Karaca, M., 2017. Bazı Bitki Gruplarında CG, CHG, CHH Metilasyon düzeyleri ve epigenetik sonuçları üzerine bir araştırma: *In Silico* ve *In Vitro* Çalışmalar", TÜBİTAK Projesi, 113O935.
- Karaca, M., Aydın, A. and Ince A. G. 2019. Cytosine methylation polymorphisms in cotton using TD-MS-RAPD- PCR, *Modern Phytomorphology*, 13: 13-19.
- Karaca, M., Ince A. G., Elmasulu S. Y., Onus A. N. and Turgut K. (2005). Coisolation of genomic and organelle DNAs from 15 genera and 31 species of plants. *Analytical Biochemistry*, 343 (2): 353–355.
- Karaca, M., Ince A. G., Gocer, E. U., and Aydın A. 2016. Exonic and intronic DNA methylation differences in a fiber specific gene of Pima cotton (*Gossypium barbadense* L.). *Journal of Scientific and Engineering Research* 3: 478-486.
- Karaca, M., Ince, A. G. and Aydın, A., 2019. Identification of a putative epiallele expressed in 25 DPA cotton fiber. 8-10 April, International Congress on Agriculture and Forestry Research, ss.493-500. Marmaris, Turkey.

- Kawakatsu. et al. 2016. Epigenomic diversity in a global collection of *Arabidopsis thaliana* accessions. *Cell*, 166: 492-505.
- Kohel, R. J., Yu, J., Park, Y. and Lazo, G. R. Molecular mapping and characterization of traits controlling fiber quality in cotton. *Euphytica*, 121: 163-172.
- Kumar, A. and Chordia, N., 2015. *In Silico* PCR Primer Designing And Validation PCR Primer Design, Springer, Cham, pp. 143-151.
- Li, T., Fan, H., Li, Z., Wei, J., Cai, Y. and Lin, Y. 2011. Effect of different light quality on DNA methylation variation for brown cotton (*Gossypium hirsutum*). *African Journal of Biotechnology*, 10 (33): 6220-6226.
- Lu, X. et al. 2017. Single-base resolution methylomes of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) reveal epigenome modifications in response to drought stress. *BMC Genomics*, 18 (297): 5-14.
- Mert, M. 2007. Pamuk Tarımının Temelleri. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası Teknik Yayınlar Dizisi: 7, Hatay, 282 s.
- Meyer, P. 2010. DNA methylation systems and target in plants. *Elsevier*, 585 (2011); 2008-2015.
- Osabe, K. Clement, J. D., Bedon, F., Pettolino, A. F., Ziolkowski, L., Llewellyn, J., Finnegan, E. J. and Wilson, I. A. 2014. Genetic and DNA methylation changes in cotton (*Gossypium*) Genotypes and Tissues, *Plos One*, 9 (1): 1-11.
- Pfluger, J. and Wagner, D. 2007. Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10 (6): 645-652.
- Piriyapongsa, J., Ngamphiw, C., Assawamakin, A., Wangkumhang, P., Suwannasri, P., Ruangrit, U., Agavatpanitch, G., and Tongsimma S. 2009. RExPrimer: an integrated primer designing tool increases PCR effectiveness by avoiding 3' SNP-in-primer and mis-priming from structural variation. *BMC Genomics*, 10 (3): 1-11.
- Rahman, M., Shaben, T., Tabbasam, N., Iqba, M. A., Asraf, M., Zafar, Y. and Paterson, A. 2012. Cotton genetic resources. A Review. *Agronomy For Sustainable Development*, 32: 419-432.
- Seelanan, T. A., Schnabel, K. And Wendel, J. F. 1997. Congruence and consensus in the cotton tribe (*Malvaceae*). *Systematic Botany*, 22 (2): 259-290.
- Seymour, G., Poole, M., Manning, K. and King, G. 2008. Genetics and epigenetics of fruit development and ripening. Elsevier, Hardtke, C. and Torii, K. (Ed.), *Current Opinion in Plant Biology*, 11, pp. 58-63.
- Smulders, M. J. M. and De Klerk, G. J. 2011. Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation*, 63: 137-146.
- Stewart, J. McD. 2010 Germplasm Resources for Physiological Research and Develoment, Springer, Cham, Phasiology of Cotton, pp. 19-23.
- Suziki, M. M. and Bird, A. 2007. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature Publishing Groups* , 9: 465–476.

- Tollefsbol, T. 2011. Handbook of Epigenetics: The New Molecular And Medical Genetics. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-6.
- Tsaftaris, A. S., Polidoros, A. N., Kapazoglou, A., Tani, E. and Kovacevic N. M., 2008. *Epigenetics and Plant Breeding Review*. 30: 49-178.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C. Remm, M. and Rozen, S. G. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40 (15): 1-15.
- Uygur Göçer, E. Mısır (*Zea mays* L.) bitkisinde DNA metilasyonu ve heterosis ilişkileri üzerine bir araştırma. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, 108 s.
- Van Ijzendoorn M.H., Bakermans-Kranenburg, M. J. and Ebstein, R. P. 2011. Methylation matters in child development: Toward developmental behavioral Epigenetics. *Child Development Perspectives*, 5 (4) : 305-310.
- Wang, J., Wang, C., Long, Y., Hopkins, C., Kurup, S., Liu, K., King, G. J. and Meng, J. 2011. Universal endogenous gene controls for bisulphite conversion in analysis of plant DNA methylation. *Plant Methods*, 7 (39): 1-7.
- Weigel, D. and Colot, V. 2012. Epialleles in plant evolution. *Genome Biology*, 13 (249): 1-6.
- Wendel, F.J., Brubaker C., Alvarez I, Cronn R, and . Stewart J. McD. 2009. Evolution and Natural History of the Cotton Genus, Springer, Cham, Genetics and Genomics of Cotton, pp. 3-22.
- Wendel, J. F. and Cronn, R. C. 2003. Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Advances in Agronomy*, 78: 139–186.
- Wendel, J. F. and Grover, E. C. 2015. Taxonomy and evolution of the Cotton genus, *Gossypium*. *Cotton*, 57: 25-44.
- Wendel, J. F. 1989. New World Tetraploid cottons contain old world cytoplasm. *Proc. Natl Acad. Sci*, 86: 4132–4136.
- Wu Z, Soliman K. M, Zipf, A., Saha, S., Sharma, G. C. and Jenkins, J. N. 2005. Isolation and characterization of genes differentially expressed in fiber of *Gossypium barbadense* L. *Journal of cotton Science*. 9 (3): 166–174.
- Wu, D. Y. W., Ugozzoli, L. , Pal, B. K., Qian, J. and Wallace, R. B. 1991. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol*, 10 (3): 233-238.
- Xi, Y. and Li, W. 2009. BSMAP: whole genome bisulfite sequence MAPping Program. *BMC Bioinformatics*, 10 (232):1-9.
- Xu, J., Kim, J., Koestler, B. J., Choi, J. H. , Waters C. M. and Fuqua, C. 2013. Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* unipolar polysaccharide production reveals complex integrated control of motile-to-sessile switch. *Molecular Microbiology*, 89 (5): 929-948.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutach, I., Rozen, S. and Madden, T. M. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13 (134): 1-11.

Zhao, Y., Yu, S., Xing, C., Fan, S., and Song, M., 2008. Analysis of DNA methylation in Cotton hybrids and their parents, *Russian in Molekulyarnaya Biologiya*, 42 (2):195–205.



ÖZGEÇMİŞ

AYŞE SAĞIR

ayse.sagir594@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2017-2020	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2012-2016	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya